



ANA CRISTINA MATHEUS MEDEIROS

**INVESTIGAÇÃO DA PREVALÊNCIA DA INFECÇÃO POR VÍRUS LINFOTRÓPICO
DAS CÉLULAS T HUMANAS (HTLV) EM GESTANTES DE ALTO RISCO**

CURITIBA

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANA CRISTINA MATHEUS MEDEIROS

**INVESTIGAÇÃO DA PREVALÊNCIA DA INFECÇÃO POR VÍRUS LINFOTRÓPICO
DAS CÉLULAS T HUMANAS (HTLV) EM GESTANTES DE ALTO RISCO**

CURITIBA

2017

ANA CRISTINA MATHEUS MEDEIROS

**INVESTIGAÇÃO DA PREVALÊNCIA DA INFECÇÃO POR VÍRUS LINFOTRÓPICO
DAS CÉLULAS T HUMANAS (HTLV) EM GESTANTES DE ALTO RISCO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tocoginecologia, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Tocoginecologia.

Orientadora: Prof. Dra. Meri Bordignon
Nogueira

Coorientadora: Dra. Luine Rosele Renaud
Vidal

CURITIBA

2017

T488 Medeiros, Ana Cristina Matheus

Investigação da prevalência da infecção por vírus linfotrópico das células T humanas (HTLV) em gestantes de alto risco.

Ana Cristina Matheus Medeiros. – Curitiba, 2016.

102 f.; 30 cm.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Meri Bordignon Nogueira

Co-orientador: Prof.^a Dr.^a Luine Rosele Renaud Vidal

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Tocoginecologia. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

1. Vírus 1 linfotrópico T humano. 2. Infecções por HTLV – 1.

3. Gestantes. I. Nogueira, Meri Bordignon. II. Vidal, Luine Rosele Renaud. III. Programa de Pós-Graduação em Tocoginecologia. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

NLMC: WH 120



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor CIÊNCIAS DA SAÚDE
Programa de Pós Graduação em TOCGINECOLOGIA
Código CAPES: 40001016084P2

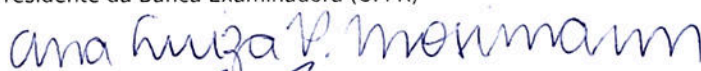
TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em TOCGINECOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **ANA CRISTINA MATHEUS MEDEIROS**, intitulada: "**INVESTIGAÇÃO DA FREQUÊNCIA DA INFECÇÃO POR VÍRUS LINFOTRÓPICO DAS CÉLULAS T HUMANAS (HTLV) EM GESTANTES DE ALTO RISCO: IMPACTO DA INFECÇÃO EM REGIÃO NÃO ENDÊMICA**", após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua

APROVAÇÃO

CURITIBA, 22 de Fevereiro de 2017.


MERI BORDIGNON NOGUEIRA
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)


ANA LUIZA PAMPLONA MOSIMANN
Avaliador Externo (ICC)


NEWTON SÉRGIO DE CARVALHO
Avaliador Interno (UFPR)

Ao meu filho Erik, minha fonte inesgotável de amor, carinho e companheirismo. Vinício meu companheiro e amigo que esteve ao meu lado nos momentos de dificuldade desta caminhada.

Aos Meus Pais Vera e Reny que são a base da minha vida, meus exemplos de amor e sabedoria.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por guiar a minha vida e minha trajetória.

À minha orientadora, Prof. Dra. Meri Bordignon Nogueira, que compartilhou seus conhecimentos e me ensinou, orientou e me incentivou para chegar aos resultados deste trabalho, com muita paciência e amizade, todo meu respeito e gratidão.

À minha coorientadora, Dra. Luine Rosele Renaud Vidal, que foi incansável, me ensinou, me orientou, foi paciente e amiga, uma grande professora, um exemplo de competência e dedicação.

Ao Prof. Dr. Newton Sergio de Carvalho pela sua dedicação, apoio e incentivo na condução do Programa de Pós-graduação.

Ao Programa de Pós-graduação em Tocoginecologia e ao Hospital de Clínicas por terem me dado a oportunidade de ampliar meus conhecimentos.

À Diretora Administrativa do CHC, Monica Evelise da Silveira, por todo seu apoio e incentivo.

À Dra. Marisol Domingues Muro, pela disponibilização da Unidade de Apoio Diagnóstico e seu apoio.

Aos Professores Dr. Sergio Monteiro de Almeida e Dra Sônia Mara Raboni por terem contribuído com suas sábias críticas e que auxiliaram com sua vasta experiência.

Aos Colaboradores deste projeto Rafaela Miravalhes, Manuella Abrão da Costa, Talita Bessani, Aline Naiara Ferin, Elisa Dahmer Kilpp, que estiveram comigo desde o início deste trabalho na coleta de dados e entrevistas com as pacientes, minhas queridas amigas que me apoiaram em todas as horas e estiveram comigo em momentos difíceis desta jornada, meu muito obrigado.

À Jucélia Stadinicki, que me passou seus conhecimentos, dedicada e paciente, a ela toda minha admiração e agradecimento.

À toda a equipe técnica do Laboratório de Virologia do HC-UFPR, que me ensinou, ajudou e se disponibilizou sempre que necessário; a eles todo meu respeito e gratidão: Luciane Aparecida Pereira, Clyete Santos da Silveira, Indianara Rotta, Francielli Brusco Moreira, Gislene R. De Almeida Takahashi, Barbara Maria Cavalli, Noely Kajiwara, Suzana Carstensen e Yudi Felipe Kondo.

À equipe de Coleta, em especial a Daisy Elias Andrusko e Neli Kaiser Machado; agradeço de todo coração.

Às pacientes que aceitaram participar deste estudo.

A todos meus familiares por terem me apoiado e incentivado e me dados forças durante esta trajetória, todo meu amor.

Ao apoio financeiro do Ministério da Saúde (UNODOC), sob o número 112/13.

Enfim, a todos aqueles que participaram deste projeto e acreditaram nele, meu muito obrigado.

“Nossas crenças se transformam em pensamentos, os pensamentos em palavras, as palavras se tornam ações e estas ações repetidas se tornam hábitos. E estes hábitos formam nossos valores e nossos valores determinam nosso destino”

Mahatma Gandhi

RESUMO

O Vírus Linfotrófico das Células T Humanas (HTLV) é um retrovírus, relacionado com o Leucemia das Células T do Adulto (LTA) e a Mielopatia Associada ao HTLV/Paraparesia Espástica Tropical (MAH/PET). A transmissão do HTLV ocorre por meio de relações sexuais, transfusão de hemocomponentes e de mãe para filho, predominantemente por meio da amamentação. O objetivo do presente estudo foi avaliar a prevalência da infecção pelo HTLV e o perfil epidemiológico das gestantes atendidas no ambulatório de pré-natal do Serviço de Tocoginecologia do Complexo Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (CHC-UFPR), no período de agosto de 2015 a agosto de 2016. Este estudo é descritivo de corte transversal, que incluiu gestantes de alto risco. Realizou-se teste laboratorial, para a detecção de anticorpos para HTLV-1/2, de acordo com o fluxograma de diagnóstico preconizado pelo Ministério da Saúde. O teste confirmatório para o HTLV-1/2 foi realizado pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), direcionados aos genes alvos *tax* e *pol*. Analisou-se um total de 643 amostras pelo método de imunoensaio de micropartículas por quimioluminescência (QMIA); destas, quatro (0,63%) apresentaram-se reagentes para HTLV, das quais duas foram confirmadas pelo método de PCR (0,31%) sendo uma HTLV-1 e outra HTLV-2. Nenhuma das pacientes apresentou manifestações clínicas neurológicas ou hematológicas devido à infecção pelo HTLV. Foram analisados dados demográficos e epidemiológicos do total de amostras por meio de questionários e análise de prontuários. A faixa de idade variou entre 14 e 47 anos, com predomínio de gestantes com idade entre 20 e 34 anos (420/65%), e prevaleceu a raça branca (541/84,14%); 183 gestantes (28,46%) possuíam ensino médio completo; 60 (9,33%) eram usuárias de drogas; 191 (29,70%) apresentavam *piercing* e 177 (27,53%) tatuagem; 271 (42,15%) iniciaram a atividade sexual entre 12 e 16 anos; 311 (48,36%) tiveram de um a cinco parceiros e 35 (5,44%) receberam transfusão sanguínea. Além do HTLV, foram analisados outros dados sorológicos, sendo encontrados os seguintes resultados: HBsAg: 549 (85,38%) não reagentes e sete (1,09%) reagentes; anti-HCV: 530 (82,43%) não reagentes e quatro (0,62%) reagentes; HIV-I/II: 548 (85,22%) não reagentes e 41 (6,38%) reagentes; toxoplasmose IgG: 312 (48,52%) não reagentes e 236 (36,70%) reagentes; toxoplasmose IgM: 544 (84,60%) não reagentes e oito (1,24%) reagentes; sífilis: 580 (90,20%) não reagentes e 25 (3,89%) reagentes. O fluxo de diagnóstico laboratorial proposto neste estudo foi válido para estabelecer a prevalência do HTLV-1/2 em gestantes de alto risco e corrobora a necessidade da confirmação da infecção pelo HTLV-1/2 por meio de métodos moleculares.

Palavras-Chave: HTLV. Gestantes de alto risco. Diagnóstico Molecular. PCR. Pré-natal.

ABSTRACT

The human T cell lymphotropic virus (HTLV) is a retrovirus, related to Adult T-Cell Lymphoma (ATL) and HTLV Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis (HAM/TSP). The transmission of HTLV occurs through sexual intercourse, transfusion of blood components and mother to child, predominantly through breastfeeding. The aim of this study was to evaluate the prevalence of HTLV infection and the demographic and epidemiological profile of the high risk pregnant women attending the prenatal clinic of the Department of Tocoginecology of the Clinicas Hospital Complex of the Federal University of Paraná (CHC-UFPR) from August 2015 to August of 2016. The study is a cross-sectional descriptive study, which included high-risk pregnancies women. It was performed laboratory tests to detected HTLV-1/2 antibodies, according to the Ministry of Health flowchart. Confirmatory test for HTLV-1/2 was performed by Polymerase Chain Reaction (PCR) directed for the target genes *tax* and *pol*. A total of 643 samples were analyzed by the method of microparticles immunoassay by chemiluminescence (CMIA); from this, four (0.63%) were reagent for HTLV and two (0.31%) were confirmed by PCR. None of them presented clinical neurological or hematological manifestations due to HTLV infection. It was analyzed demographic and epidemiological data from the total samples using questionnaires and medical records. The age range varied between 14 and 47 years, with predominance of pregnant women aged between 20 and 34 years (420/65%). The white race prevailed (541/84.14%) and 183 (28.46%) patients had completed high school. The total of drug users were 60 (9.33%), 191 (29.70%) presented piercing and 177 (27.53%) tattoo. Of the total number of patients, 271 (42.15%) started sexual activity between 12 and 16 years old. Regarding the number of partners, 311 (48.36%) had one to five partners and 35 (5.44%) received blood transfusion. In addition to HTLV, other serological data were analyzed, being founded the following results: HBsAg: 549 (85.38%) non-reactive and 7 (1.09%) reagents; Anti-HCV: 530 (82.43%) non-reactive and 4 (0.62%) reagents; HIV-I/II: 548 (85.22%) non-reactive and 41 (6.38%) reagents; toxoplasmosis IgG: 312 (48.52%) non-reactive and 236 (36.70%) reagents; toxoplasmosis IgM: 544 (84.60%) non-reactive and 8 (1.24%) reagents; syphilis: 580 (90.20%) non-reactive and 25 (3.89%) reagents. The flowchart for the laboratory diagnostic proposed in this study were valid to establish the prevalence of HTLV in high risk pregnant women and corroborate the necessity to confirm the HTLV-1/2 by the use of molecular methods.

Key words: HTLV. High Risk Pregnant Women. Molecular Diagnostic. PCR. Prenatal.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	ESTRUTURA DO HTLV-1	20
FIGURA 2	ESTRUTURA GENÔMICA DO HTLV-1	22
FIGURA 3	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO CICLO VIRAL DO HTLV	23
FIGURA 4	DISTRIBUIÇÃO DO HTLV-1 NO MUNDO	28
FIGURA 5	TESTE DE TRIAGEM E CONFIRMATÓRIO DO HTLV- ALGORITMO	36
FIGURA 6	FLUXOGRAMA UTILIZADO PARA A PADRONIZAÇÃO DOS MÉTODOS MOLECULARES	44
FIGURA 7	FLUXOGRAMA DE TESTAGEM DAS AMOSTRAS DO ESTUDO (GESTANTES).	54
FIGURA 8	<i>WESTERN BLOT</i> DE UMA AMOSTRA POSITIVA	55
FIGURA 9	SINAIS OBTIDOS NA PCR DO GENE <i>pol</i> E <i>tax</i> DO HTLV: GEL CORADO COM BROMETO DE ETIDIO	57
FIGURA 10	MATRIZ DE IDENTIDADE DA SEQUÊNCIA DA AMOSTRA SELECIONADA COMO CONTROLE POSITIVO E SEQUÊNCIAS DE HTLV (GENE <i>pol</i>) DISPONÍVEIS NO GENBANK	58
FIGURA 11	FLUXOGRAMA UTILIZADO NA ANÁLISE DAS AMOSTRAS DAS GESTANTES	60
FIGURA 12	SINAIS OBTIDOS NA <i>nested</i> PCR DO GENE <i>pol</i> E <i>tax</i> DO HTLV DAS DUAS AMOSTRAS POSITIVAS	61
FIGURA 13	AVALIAÇÃO FILOGENÉTICA BASEADA NO ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS DE REGIÃO DO GENTE <i>tax</i> PELO MÉTODO DA MÁXIMA VEROSSIMILHANÇA	62

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE PCR E SEQUENCIAMENTO E SUAS CARACTERÍSTICAS.....	50
TABELA 2	ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS OPERACIONAIS DA METODOLOGIA DE PCR CONVENCIONAL	59
TABELA 3	CONCORDÂNCIAS DOS RESULTADOS OBTIDOS PELOS DIFERENTES MÉTODOS PARA OS GRUPOS DA PADRONIZAÇÃO.....	59
TABELA 4	RESULTADOS SOROLÓGICOS PARA HTLV DAS QUATRO PACIENTES	61
TABELA 5	DADOS DEMOGRÁFICOS DAS 643 PACIENTES INCLUÍDAS NO ESTUDO RELATIVOS À IDADE, RAÇA E ESCOLARIDADE	63
TABELA 6	DADOS EPIDEMIOLÓGICOS DAS 643 PACIENTES.....	64
TABELA 7	PERFIL SOROLÓGICO DAS 643 PACIENTES	65
TABELA 8	HISTÓRICO OBSTÉTRICO DAS 643 PACIENTES	66
TABELA 9	DADOS DEMOGRÁFICOS, EPIDEMIOLÓGICOS, HISTÓRICO OBSTÉTRICO E LEVANTAMENTO SOROLÓGICO DAS QUATRO PACIENTES HTLV POSITIVAS PELO MÉTODO DE QMIA E PCR	67

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1	PORCENTAGEM DE SOROPOSITIVIDADE PARA O HTLV-1/2 EM AMOSTRAS DE GESTANTES E PUÉRPERAS EM ESTUDOS MUNDIAIS.....	30
QUADRO 2	PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS HTLV 1/2 NO BRASIL ENTRE DOADORES DE SANGUE.....	31
QUADRO 3	PREVALÊNCIA DA INFECÇÃO DO HTLV NO BRASIL.....	32
QUADRO 4	PORCENTAGEM DE SOROPOSITIVIDADE PARA O HTLV-1/2 EM AMOSTRAS DE GESTANTES, PUÉRPERAS E NEONATOS EM ESTUDOS BRASILEIROS	34
QUADRO 5	PORCENTAGEM DE SOROPOSITIVIDADE PARA O HTLV-1/2 EM AMOSTRAS DE GESTANTES, PUÉRPERAS E BANCOS DE SANGUE EM ESTUDOS BRASILEIROS.....	35

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACD	-	Ácido citrato dextrose
CD4+	-	Linfócitos T CD4
CD8+	-	Linfócitos T CD8
CMIA	-	<i>Chemiluminescent Immunnoassay</i>
CHC- UFPR	-	Complexo Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná
DIH	-	Dermatite infecciosa associada ao HTLV-1
DNA	-	Ácido Desoxirribonucléico
DST	-	Doença sexualmente transmissível
EDTA	-	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EIA	-	Ensaio imunoenzimático
env	-	Envelope
FN	-	Falso negativo
FP	-	Falso positivo
gag	-	Grupo antigênico
gp	-	Glicoproteína
gp21	-	Glicoproteína transmembrana
gp46	-	Glicoproteína de superfície
HBZ	-	Gene codificado pela fita complementar negativa
HLA	-	Antígeno Leucocitário Humano (<i>Human Leucocitary Antigen</i>)
HTLV	-	Vírus linfotrópico das células T humanas
IL-2	-	Interleucina-2
IMC	-	Índice de massa corporal
Kb	-	Kilobase
LCR	-	Líquido cefalorraquidiano
LTA	-	Leucemia das Células T do Adulto
LTR	-	Extremidades terminais repetidas (<i>Long Terminal Repeats</i>)
MA	-	Proteína da matriz
MAH	-	Mielopatia associada ao HTLV
MAH/PET	-	Mielopatia associada ao HTLV-1/Paraparesia espástica tropical
mRNA	-	RNA mensageiro

NCBI	-	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NK	-	<i>Natural killer</i>
nm	-	Nanômetro
OPD	-	Ortofenileno diamina
ORF	-	Fase de Leitura aberta (<i>Open Reading Frame</i>)
p12	-	Proteína acessória
p30 e p13	-	Proteínas acessórias
p15	-	Proteína do nucleocapsídeo
p19	-	Proteína da Matriz
p24	-	Proteína do Capsídeo
pb	-	Pares de base
PBS	-	Tampão salina fosfatada (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PCR	-	Reação em cadeia da Polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PET	-	Paraparesia Espástica Tropical
pol	-	Polimerase
pX	-	Gene regulatório
QMIA	-	Quimioluminescência
q.s.p.	-	Quantidade suficiente para
RDC	-	Resolução da Diretoria Colegiada
RNA	-	Ácido Ribonucléico
RNAse	-	Enzima específica para digestão de RNA
TAX	-	Proteína Viral regulatória
TCLE	-	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TMB	-	Tetrametil benzidina
TR	-	Transcriptase reversa
ULR	-	Unidade de luz relativa
VN	-	Verdadeiro negativo
VP	-	Verdadeiro positivo
WB	-	<i>Western Blot</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1	HISTÓRIA DO HTLV	18
2.2	ESTRUTURA VIRAL E ORGANIZAÇÃO GENÔMICA	19
2.3	CICLO REPLICATIVO	22
2.4	PATOGENIA.....	23
2.5	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	25
2.5.1	Leucemia das células T do adulto (LTA).	25
2.5.2	Mielopatia associada ao HTLV ou paraparesia espástica tropical (MAH/PET).	26
2.5.3	Outras manifestações clínicas.....	27
2.6	EPIDEMIOLOGIA DO HTLV.....	28
2.6.1	HTLV-1/2 no mundo	29
2.6.2	Epidemiologia no Brasil.	30
2.6.3	Epidemiologia no estado do Paraná.....	35
2.7	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	36
2.7.1	Testes de triagem.....	37
2.7.2	Testes complementares.	37
3	JUSTIFICATIVA.....	41
4	OBJETIVOS	42
4.1	OBJETIVO GERAL.....	42
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
5	MATERIAL E MÉTODOS	43
5.1	CASUÍSTICA.....	43
5.1.1	Padronização do método molecular	43
5.1.2	Gestantes de alto risco.....	44
5.1.3	Coleta de dados e amostras.....	45
5.1.4	Critérios de inclusão	46
5.1.5	Critérios de exclusão	46
5.2	MÉTODOS LABORATORIAIS UTILIZADOS.....	46
5.2.1	Imunoensaio de micropartículas por quimioluminescência (QMIA).	47

5.2.2	Teste complementar confirmatório - <i>Western Blot</i>	47
5.2.3	Teste complementar confirmatório - Método Molecular.....	48
5.2.3.1	Obtenção do concentrado de leucócitos (<i>buffy coat</i>).....	48
5.2.3.2	Extração do DNA proviral do HTLV a partir do concentrado de leucócitos (<i>buffy coat</i>).....	49
5.2.3.3	PCR convencional.....	50
5.2.3.4	Clonagem do produto de PCR da padronização.....	51
5.2.3.5	Sequenciamento nucleotídico.....	52
5.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA DA PADRONIZAÇÃO.....	53
6	RESULTADOS	55
6.1	PADRONIZAÇÃO DA METODOLOGIA MOLECULAR.....	55
6.1.1	Métodos moleculares.....	55
6.1.1.1	Obtenção do <i>buffy coat</i>	55
6.1.1.2	Extração do DNA proviral.....	56
6.1.1.3	PCR para β globina.....	56
6.1.1.4	PCR para gene <i>pol</i> e <i>tax</i> do HTLV.....	56
6.1.2	Sequenciamento do material clonado.....	57
6.2	GESTANTES.....	60
6.2.1	Prevalência de HTLV-1/2 nas gestantes com resultados reagentes para HTLV.....	60
6.2.1.1	Sequenciamento das amostras positivas das gestantes.....	61
6.2.2	Perfil demográfico e epidemiológico das pacientes.....	63
7	DISCUSSÃO	69
8	CONCLUSÃO	75
9	PERSPECTIVAS	76
	REFERÊNCIAS	77
	APÊNDICE 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)	97
	APÊNDICE 2 - QUESTIONÁRIO APLICADO NA PESQUISA	98
	ANEXO 1 - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO CHC- UFPR	101

1 INTRODUÇÃO

O vírus linfotrópico das células T humanas (HTLV) foi o primeiro retrovírus humano isolado a partir de linfócitos de um paciente com linfoma cutâneo de células T, no ano de 1980 (POIESZ et al., 1980). O HTLV é um vírus que, após a infecção, apresenta um período de latência, visto que as manifestações clínicas ocorrem geralmente a partir da quarta década de vida. As doenças associadas a ele são a leucemia das células T do adulto (LTA), mielopatia associada ao HTLV/paraparesia espástica tropical (MAH/PET) (GESSAIN et al., 1985; KAPLAN; OSAME; KUBOTA, 1990; RIBAS; MELO, 2002), além de síndromes como neuropatias, uveíte, bexiga neurogênica, disfunção erétil (MOCHIZUKI et al., 1996; CASTRO et al., 2005; OLIVEIRA; CASTRO; CARVALHO, 2007) e dermatite infecciosa, sendo uma das primeiras manifestações clínicas em crianças infectadas pela transmissão vertical (LAGRENADE; SCHWARTZ; JANNIGER, 1996; LANEGRAD et al., 1998).

A transmissão do vírus ocorre por meio de relações sexuais, via parenteral, por meio de transfusão de hemocomponentes, uso de drogas injetáveis e transmissão vertical, predominantemente por meio da amamentação (PROIETTI et al., 2005). A eficiência da transmissão do HTLV está relacionada com a via de aquisição do vírus, sendo que a via parenteral é a rota mais eficiente e na transmissão vertical é a amamentação (WIKTOR et al., 1997; HISADA et al., 2002). A triagem sorológica para anticorpos anti-HTLV-1/2, nos bancos de sangue, foi implementada em dezembro de 1993, regulamentada pela Portaria nº 1376/1993 do Ministério da Saúde (BRASIL, 1993). Esta medida tem sido importante na prevenção da transmissão do vírus pela via parenteral.

Considera-se que 15% a 20% das crianças amamentadas por mãe soropositiva adquirem a infecção por HTLV, sendo que, na ausência do aleitamento materno, esta taxa é inferior a 3% (TSUJI et al., 1990; KASHIWAGI et al., 2004). Segundo estudo de 2005, cerca de 1 a 5% das crianças que adquirirem a infecção por transmissão vertical irá desenvolver a LTA (PROIETTI et al., 2005).

Há poucos estudos avaliando a frequência de infecção pelo HTLV-1 entre gestantes no Brasil, sendo relatados índices que variam de 0,08 a 1,10% (ANDRADE et al., 1996; BITTENCOURT et al., 2001; FIGUEIRÓ-FILHO et al.,

2005). A investigação do HTLV nas rotinas de pré-natal dos atendimentos de saúde é escassa e pouco se sabe sobre a incidência deste vírus nessa população.

Os ensaios de triagem detectam anticorpos contra o HTLV-1/2, no entanto, devido à elevada sensibilidade, podem detectar amostras falso positivas, sendo necessária a confirmação do resultado por ensaios com alta especificidade e capazes de distinguir a infecção devida ao HTLV-1 daquela causada pelo HTLV-2.

O objetivo do presente estudo é avaliar a prevalência da infecção pelo HTLV por meio de testes sorológicos e moleculares, em gestantes submetidas à triagem pré-natal e oferecer um diagnóstico acurado e preciso para orientar os serviços de saúde na adoção de medidas de aconselhamento, prevenção e qualidade de vida aos portadores ou pacientes que já desenvolveram doenças devido ao HTLV. Os dados obtidos por meio de levantamentos epidemiológicos fornecerão informações importantes sobre o padrão da infecção no Estado do Paraná, podendo reforçar a necessidade de estabelecer estratégias de vigilância ativa em gestantes, lactentes e outros contatos familiares como uma importante ação de vigilância epidemiológica, objetivando a detecção precoce da infecção pelo vírus e prevenindo a transmissão pela via vertical e sexual.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HISTÓRIA DO HTLV

Os vírus da família *Retroviridae* foram identificados em 1910, quando Peyton Rous isolou o primeiro retrovírus, o *Rous Sarcoma Vírus*, responsável pelo desenvolvimento de sarcoma em aves, sendo considerado o protótipo da família *Retroviridae*. Na década de 70, com o descobrimento da transcriptase reversa por Temin, Baltimore e Mizutani, foi possível descobrir alguns mecanismos relacionados a biologia desses vírus, o que conferiu a denominação de retrovírus à família (BALTIMORE, 1970; TEMIN; MIZUTANI, 1970).

O HTLV-1 foi o primeiro retrovírus humano descrito, em 1980, a partir de células T derivadas de linfonodos e linfócitos do sangue periférico de um paciente com linfoma cutâneo. Devido às suas propriedades físico-químicas, foi incluído na família *Retroviridae* (POIESZ et al., 1980) e reconhecido como o agente etiológico da LTA (POIESZ et al., 1980, YOSHIDA; MIYOSHI; HINUMA, 1982).

Em 1980, em estudo realizado no sudoeste do Japão, que incluiu pacientes com manifestações clínicas de LTA, observou-se que estes apresentaram anticorpos anti-HTLV-1, fornecendo evidências para a ligação deste às células T malignas da LTA (UCHIYAMA et al., 1977; GALLO et al., 1983).

Um estudo conduzido na Martinica, no Caribe, mostrou que 60% dos pacientes com MAH/PET, eram soropositivos para HTLV-1 (GESSAIN et al., 1985). Em 1986, no Japão, foi demonstrado o caráter neurotrópico do HTLV-1, sendo este vírus relacionado à mielopatia; como não era uma região tropical, foi proposto o nome de mielopatia associada ao HTLV-1 (MAH) (OSAME et al., 1986). As características clínicas e laboratoriais das patologias mostraram que se tratava da mesma doença, sendo o termo combinado MAH/PET adotado e utilizado desde então (JACOBSON et al., 1988).

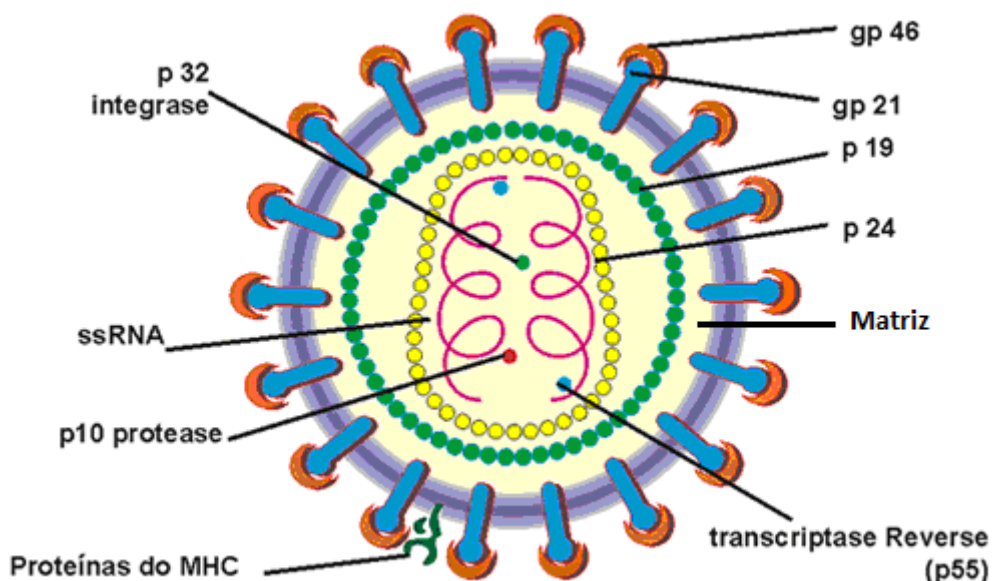
Em 1982, foi identificado o vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 2 (HTLV-2) numa linhagem imortalizada de células T, obtidas de um paciente com tricoleucemia (KALYANARAMAN et al., 1982). A infecção pelo HTLV-2 acomete,

principalmente, usuários de drogas injetáveis, indígenas (VANDAMME et al., 2000; PAIVA; CASSEB, 2015) e populações africanas remotas (ROUCOUX; MURPHY, 2004). Em 2005, em populações do sul de Camarões e em populações da África Central, foram identificados os tipos 3 (HTLV-3) e 4 (HTLV-4), ainda não associados à doença em humanos (CALATTINI et al., 2005; WOLFE et al., 2005).

2.2 ESTRUTURA VIRAL E ORGANIZAÇÃO GENÔMICA

O HTLV pertence à família *Retroviridae*, à subfamília *Orthoretrovirinae*, gênero *Deltaretrovirus*. É um vírus envelopado, com diâmetro de aproximadamente 100 a 140 nm, constituído por genoma RNA, o qual apresenta uma estrutura formada pelos genes *gag*, *pol* e *env*. A partícula viral está recoberta por um envelope constituído de uma bicamada lipídica, de origem celular, que contém as glicoproteínas virais gp46 e gp21 codificadas pelo gene viral *env* (TANGY, 1996; LE BLANC; DOKHÉLAR, 2001; GESSAIN, 2004). A glicoproteína com 46 KD (gp46), apresenta uma diferença no padrão de bandas à eletroforese, que permite distinguir os tipos 1 e 2 de HTLV (Figura 1). O gene *gag* codifica as proteínas p15 que constitui o nucleocapsídeo, p24 que compõe o capsídeo, e no interior do nucleocapsídeo encontram-se as enzimas protease, DNase H, integrase e transcriptase reversa, além da p19 que forma a matriz protéica (HJELLE, 1991; WHITE; FENNER, 1994; TANGY, 1996; HÖLLSBERG, 1999).

FIGURA 1 - ESTRUTURA DO HTLV-1



FONTE: Adaptado de ROMANOS et al. (2002).

O HTLV apresenta o genoma composto de duas moléculas de RNA de fita simples de polaridade positiva com tamanho de aproximadamente 9 Kb. Apresenta uma estrutura genética similar aos demais retrovírus, formada pelos genes *gag*, *pol* e *env*, além de uma sequência próxima à extremidade 3' conhecida como região pX, a qual contém os genes reguladores *tax* e *rex*, os quais são essenciais para o processo de replicação viral. Completando a estrutura do genoma estão as regiões flanqueadoras, sendo duas regiões repetidas, LTR (*Long Terminal Repeats*), as quais são importantes na integração do DNA pró-viral ao DNA cromossômico do hospedeiro, bem como na regulação transcricional do genoma viral (GREEN; CHEN, 2001; ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2005).

O gene *pol* codifica a enzima viral transcriptase reversa (TR), RNase H e integrase. A TR é responsável pela síntese do DNA viral a partir do seu genoma RNA. A RNase H atua na remoção da fita molde de RNA após a síntese da cadeia de DNA, degradando seletivamente o RNA da molécula híbrida DNA-RNA; já a integrase é responsável pela integração do DNA viral no genoma da célula hospedeira. O gene *env* codifica as proteínas do envelope viral (*env*). A proteína

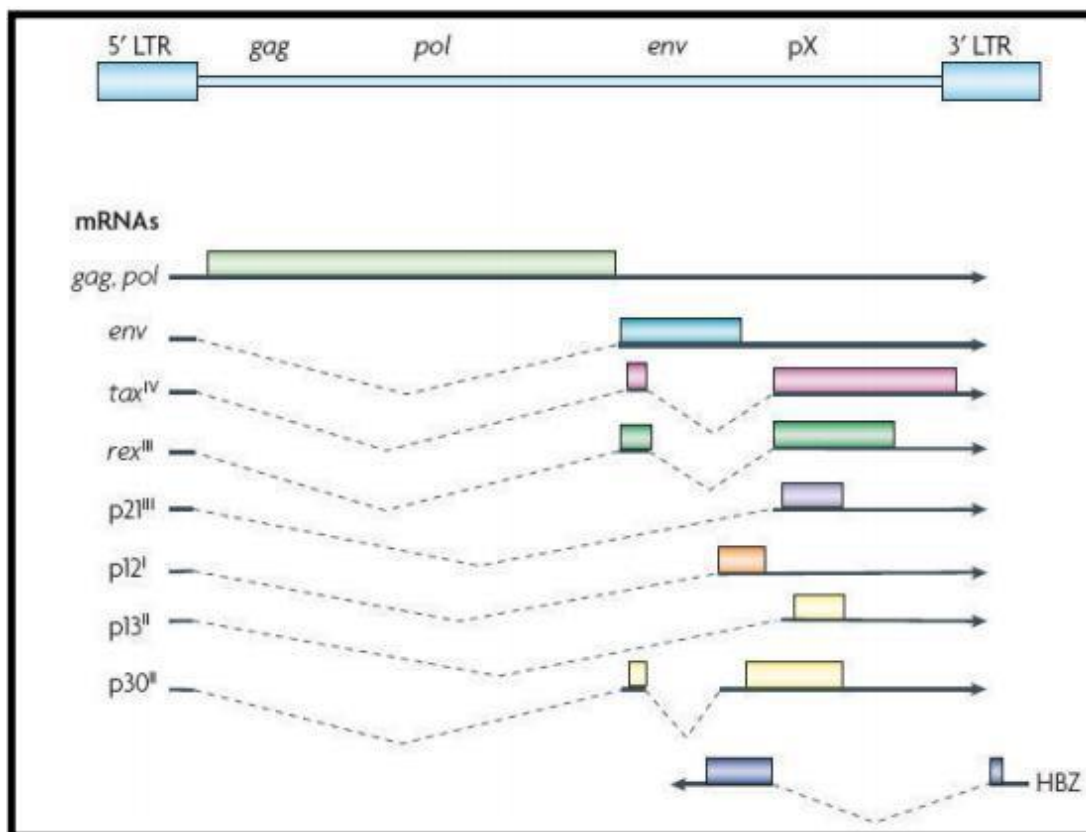
precursora do *env* é clivada para gerar os produtos maduros, a glicoproteína de superfície (gp46) e uma proteína transmembrana (gp21), sendo ambas importantes para a interação com a célula alvo e posterior infecção (SHIMOTOHNO et al, 1985).

O gene *gag* está relacionado à síntese da enzima protease, cujo gene codificador estende-se da porção 3' da região *gag* até a porção 5' da *pol*. A protease é auto clivada, gerando a molécula ativa responsável pelo processamento dos produtos dos genes *gag* e *gag-pol*. A porção 5' do gene *pol*, por sua vez, é conhecida por codificar a enzima TR. A região situada imediatamente antes da região LTR 3', denominada pX, contém 4 *Open Reading Frames* (ORFs). A ORF-I do gene pX codifica a proteína p12 (KORALNIK et al., 1992, 1993; FUKUMOTO et al., 2009) e a ORF-II codifica as proteínas p13 e p30 (CIMINALE et al., 1992; KORALNIK et al., 1992). Há evidências de que a p12, p30, p27 (*rex*), p13 e HBZ contribuem para a persistência da infecção *in vivo*, através do efeito dos produtos gênicos na replicação viral e na proliferação de células infectadas (MATSUOKA; JEANG, 2007). Adicionalmente, a p27 (*rex*) desempenha um papel fundamental na replicação viral e na regulação de genes estruturais virais, atuando como um regulador pós-transcricional que aumenta a expressão de mRNAs virais (GHEZELDASHT et al., 2013).

A proteína p40 (*tax*) é uma proteína indutora da tradução, responsável por ativar a transcrição do gene U3 na região LTR, dando início ao processo de transcrição dos pró-vírus. As duas regiões LTR são idênticas, localizadas nas extremidades do DNA viral, e contêm regiões promotoras virais, bem como outros elementos regulatórios (Figura 2).

O HTLV-1 e o HTLV-2 possuem homologia de 60% e diferenciam-se principalmente pela região pX. Ambos possuem tropismo para linfócitos T, porém o HTLV-1 infecta preferencialmente linfócitos T CD4+, enquanto o HTLV-2, linfócitos T CD8+ (SANTOS; LIMA, 2005).

FIGURA 2 - ESTRUTURA GENÔMICA DO HTLV-1



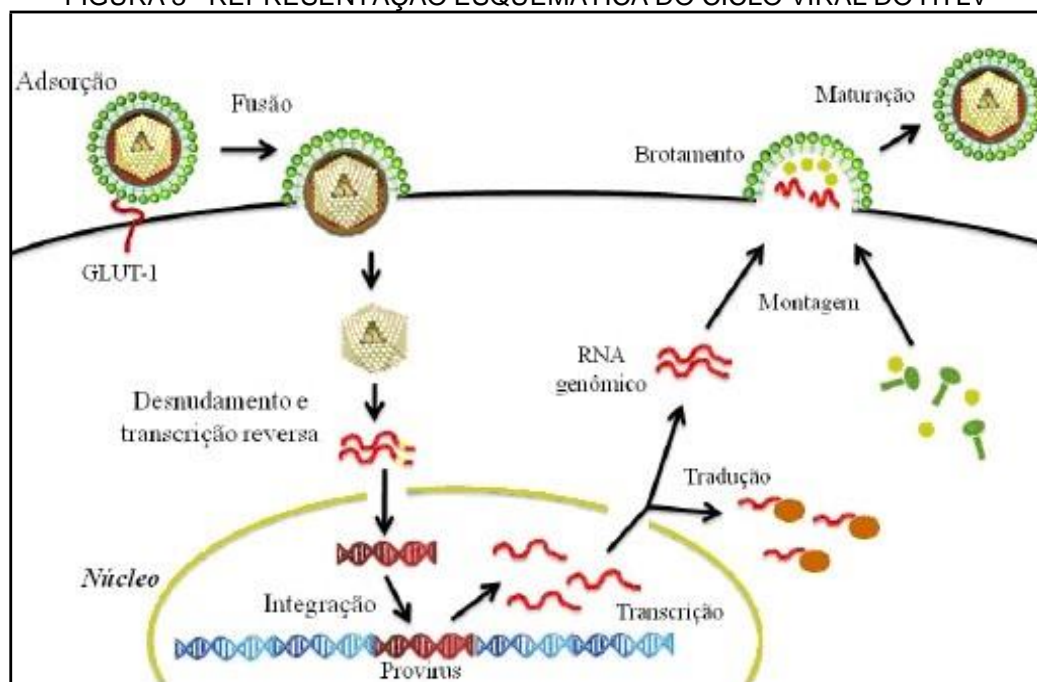
FONTE: MATSUOKA; JEANG (2007)

NOTA: Indicação dos genes e principais moléculas de mRNA produzidas durante a transcrição.

2.3 CICLO REPLICATIVO

A primeira etapa do ciclo de replicação é a ligação do vírus a receptores na célula hospedeira, o linfócito T. Após a entrada do vírus no linfócito T, por meio da enzima transcriptase reversa, ocorre síntese de DNA a partir do RNA viral. O DNA obtido é posteriormente integrado ao genoma da célula hospedeira, pela ação da enzima integrase, originando a forma proviral. Após a integração, a síntese do RNA viral é realizada utilizando a maquinaria celular, sendo as novas moléculas de RNA incorporadas nas partículas virais em formação, ou então processadas para formar as proteínas da estrutura do vírus, bem como as enzimas virais. As partículas virais são liberadas das células por brotamento, a partir da membrana celular, e infectam novas células (Figura 3). O organismo identifica essas partículas como estranhas e inicia a produção de anticorpos, que poderão ser detectados por testes sorológicos.

FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO CICLO VIRAL DO HTLV



FONTE: Adaptado de NISOLE; SAIB (2004).

2.4 PATOGENIA

A transmissão do HTLV-1/2 pode ocorrer por três vias: materno-infantil, contato sexual e transmissão parenteral (KAZANJI; GESSAIN, 2003). Segundo estudos no Japão, a transmissão por contato sexual é mais eficiente quando ocorre do homem para a mulher (KAJIYAMA et al., 1986a; CATALAN-SOARES; PROIETTI; CARNEIRO-PROIETTI, 2001). Presume-se que a transmissão por essa via ocorra por meio de linfócitos infectados presentes no sêmen e na secreção vaginal (KAJIYAMA et al., 1986a). A transmissão por via transfusional se dá por meio da recepção de componentes celulares sanguíneos contaminados. Estima-se que 4 a 8% dos pacientes infectados por transfusões nas regiões endêmicas podem vir a desenvolver MAH/PET (OSAME et al., 1990). Em outro estudo realizado no Japão, avaliando transmissão transfusional nessas áreas de alta prevalência, foi observado que a eficiência de contaminação dos receptores por essa via ocorreu em 20% a 63% dos receptores (OKOCHI; SATO; HINUMA, 1984). Outra via de transmissão conhecida é pelo compartilhamento de agulhas por usuários de drogas intravenosas

(VRIELINK; REESINK, 2004; COOPER, 2009).

A via de transmissão vertical mais comum do HTLV, tanto para o tipo 1 quanto para o tipo 2, é o aleitamento materno, devido à presença de linfócitos contaminados no leite. Considera-se que 15% a 20% das crianças amamentadas por mães soropositivas adquirem a infecção por HTLV, ressaltando-se que na ausência do aleitamento materno esta taxa é inferior a 3% (TSUJI et al., 1990; KASHIWAGI et al., 2004). A transmissão do HTLV pode ocorrer ainda por via transplacentária ou hematogênica, com contaminação do feto no canal do parto, por via ascendente ou contato íntimo entre a mãe e a criança, sendo em menor frequência (4% a 14%) (BITTENCOURT et al., 1998, 2002). Demonstrou-se ainda que o vírus se propaga silenciosamente nas famílias e que existe uma agregação familiar dessa infecção (DA COSTA et al., 2013).

Em outro estudo, os níveis de carga proviral de HTLV-1 foram avaliados como importantes preditores de desenvolvimento de LTA e MAH/PET. Muitos relatos demonstram que a carga proviral do HTLV-1 é significativamente maior em LTA e MAH/PET, em comparação com os portadores do HTLV-1 (GHEZELDASHT et al., 2013).

O HTLV-1 infecta principalmente linfócitos T CD4+, mas também linfócitos TCD8+ e as células NK; as células infectadas podem ser imortalizadas e transformadas pelo vírus (CHEN et al., 2015). Na patogênese pelo HTLV, as proteínas virais TAX e REX são importantes proteínas regulatórias. A TAX é capaz de estimular ou reprimir a expressão ou inativar um conjunto de genes celulares que atuam como inibidores do crescimento celular, podendo inibir o reparo do DNA e os eventos de morte celular programada, protegendo as células da apoptose (SODROSKI et al., 1984; FRANCHINI et al., 1995; FERREIRA; PLANELLES; ROSENBLATT, 1997; YOSHIDA, 2001). A proteína TAX é essencial para a expressão viral, podendo induzir indiretamente a expressão de genes celulares e este evento pode ter um papel importante na transformação da célula infectada pelo HTLV, e na ativação de genes celulares, tais como genes de citocinas e proto-oncogenes. A ativação e a proliferação anômala dos linfócitos T são responsáveis pelo aparecimento da LTA (SODROSKI et al., 1984).

O processo inicial da transformação, a latência clínica prolongada e o motivo pelo qual apenas 2% a 5% das pessoas infectadas com HTLV-1 desenvolvem a

LTA, são fatos ainda não esclarecidos. Contudo, algumas evidências têm sugerido como fatores de risco para o desenvolvimento de LTA a hereditariedade, a transmissão vertical do vírus (YASUNAGA; MATSUOKA, 2007), além do aumento do número de linfócitos atípicos associado à carga proviral (HISADA, 1998a, 1998b).

A proliferação indiscriminada de células pode provocar também a expansão de células T auto-reativas e secreção acentuada de citocinas pró-inflamatórias como o TNF-alfa. Essas anormalidades podem associar-se com lesão tecidual cutânea e neurológica que está associado à MAH/PET (BARMAK; HARHJ; WIGDAHL, 2003).

2.5 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

2.5.1 Leucemia das células T do adulto (LTA)

A LTA é uma doença de célula T que ocorre em 1 a 5% das pessoas infectadas com o HTLV-1, sendo mais frequente em homens (BLATTNER et al., 1982; KONDO et al., 1987). A maior incidência de LTA ocorre, em geral, após a terceira década de vida, tendo sua expressão máxima em indivíduos de 40 a 60 anos de idade (SHIMOYAMA, 1991).

A leucemia é uma doença agressiva e letal, em que o paciente infectado apresenta sobrevida de aproximadamente seis meses. Os sintomas característicos são: mal-estar, febre, hipercalcemia, hepatoesplenomegalia, icterícia, perda de peso, entre outros. As evidências que demonstraram o papel do HTLV-1 na etiologia da LTA são: a presença dessa doença em região endêmica para esse vírus, presença de anticorpos para HTLV-1 em pacientes com LTA e a integração do DNA proviral nas células leucêmicas dos pacientes, reforçando que a LTA seja resultado da transformação maligna de uma célula previamente infectada com o HTLV-1. Para o diagnóstico de LTA é necessário que o paciente apresente características que preencham os critérios de diagnóstico tais como: anticorpos anti-HTLV-1/2; presença de células malignas linfóides da linhagem T (CD2, CD3, CD4+ e CD25+) e comprovação da integração do HTLV-1 proviral monoclonal. Devido à superposição

de sinais clínicos com outras doenças linfoproliferativas, a LTA possivelmente permanece subdiagnosticada em vários países do mundo, inclusive no Brasil (FERREIRA; PLANELLES; ROSENBLATT, 1997).

2.5.2 Mielopatia associada ao HTLV ou paraparesia espástica tropical (MAH/PET)

A MAH/PET associada ao HTLV-1 é uma doença crônica, progressiva e desmielinizante que causa danos ao tecido nervoso, decorrente de resposta pró-inflamatória exacerbada, na tentativa de controlar o agente infeccioso. Dentre os fatores de risco para a transformação de portador assintomático para portador de mielopatia, destaca-se carga proviral elevada e alelos HLA do hospedeiro, atuantes na modulação da resposta imunológica (WHYTE, 1997; JEFFERY et al., 2000; TAKENOUCHI et al., 2003). É mais frequente em mulheres e acomete 0,2 a 5% dos indivíduos com sorologia positiva para o HTLV. Os sintomas iniciais são fraqueza e rigidez dos membros inferiores. Os pacientes também podem apresentar distúrbios esfinterianos, dor lombar e perda sensorial (SOUZA et al., 2006).

Evidências sugerem que o tecido nervoso seja lesado de forma indireta pelo HTLV-1. Linfócitos infectados, apresentando maior capacidade de migração para o interior do sistema nervoso central, liberariam citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e outros fatores neurotóxicos que seriam lesivos às células do tecido nervoso (OSAME et al., 1990; OHBO et al., 1991; KURODA et al., 1993; BIDDISON et al., 1997). No líquido cefalorraquidiano (LCR) de pacientes com MAH/PET, pode-se encontrar anticorpo anti-HTLV-1 através da pesquisa sorológica pelo método de ensaio imunoenzimático (ELISA) e sua confirmação é feita pelo teste *Western Blot* (WB) e/ou PCR, associado ao diagnóstico clínico desta patologia (NASCIMENTO et al., 1995).

2.5.3 Outras manifestações clínicas

A dermatite infecciosa associada ao HTLV-1 (DIH) é uma forma de eczema infectado e recidivante associado à infecção pelo *Staphylococcus aureus*. Esta doença foi descrita na Jamaica por Sweet em 1966, sendo posteriormente relacionada ao HTLV-1 (SWEET, 1966; LAGRENADE et al., 1990). A transmissão, nesses casos, é por via vertical, geralmente iniciando-se após os 18 meses de vida e raramente persistindo até a vida adulta (GONÇALVES et al., 2000). A frequência da DIH é superior no sexo feminino, variando de 60 a 65% (OLIVEIRA et al., 2005; LAGRENADE et al., 1998).

As manifestações urinárias e sexuais podem aparecer no estágio inicial da MAH/PET. A bexiga neurogênica é a disfunção vesicoesfinteriana de origem neurológica que acomete pacientes com MAH/PET e ocorre em 4% dos seus portadores, sendo uma das principais complicações destes pacientes a infecção urinária frequente, além do constrangimento social (CAMPIONI, 2002). A disfunção erétil é relatada em 88,2% dos pacientes com MAH/PET, sendo que, na população em geral, essa taxa é de 17% (OLIVEIRA et al., 1998).

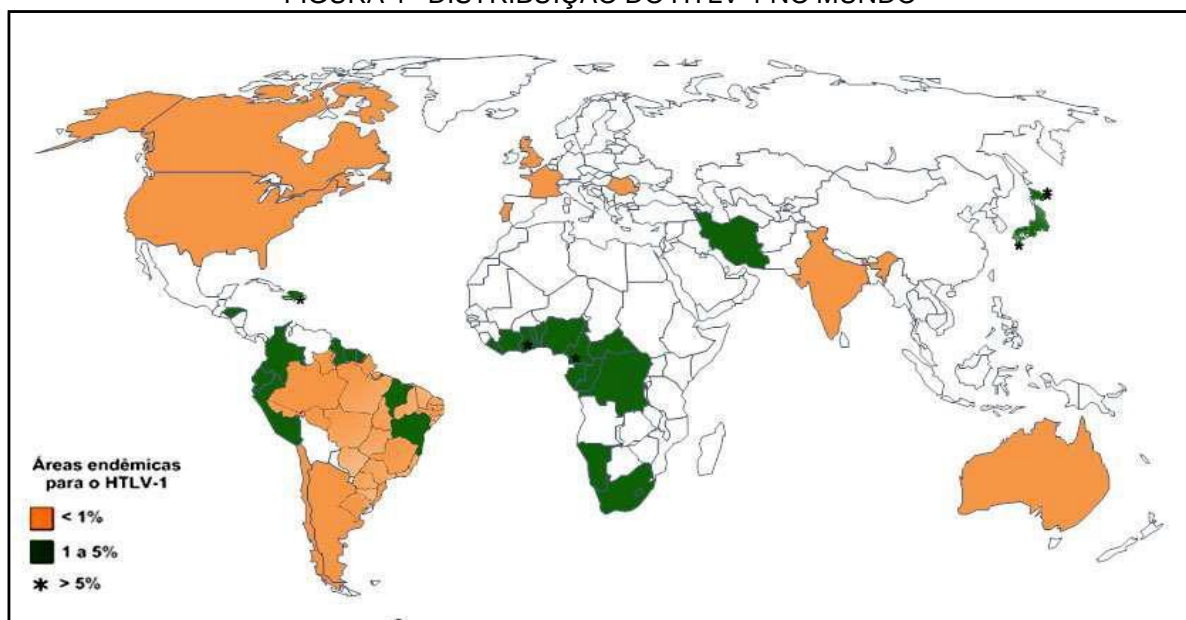
O HTLV-1 tem sido relacionado ao desenvolvimento de alterações oftalmológicas, sendo a mais prevalente a uveíte associada ao HTLV e ceratoconjuntivite. No Japão, a soroprevalência para HTLV-1 entre pacientes com uveíte idiopática varia de 35,4 a 44,8% (MOCHIZUKI et al., 1992). Em estudo conduzido em Minas Gerais, em 55 pacientes com uveíte idiopática, foi detectada a presença de anticorpos para o HTLV em 3,6% (PINHEIRO et al., 1996).

Podem ocorrer manifestações reumatológicas associadas ao HTLV-1, sendo as mais frequentes a artrite e a síndrome de Sjögren. A síndrome de Sjögren, caracterizada pela infiltração por linfócitos T nas glândulas salivares e lacrimais, causa a secura da mucosa oral e conjuntival. A associação entre HTLV-1 e a síndrome de Sjögren foi descrita por Vernan e colaboradores em 1988. A artrite em pacientes infectados pelo HTLV-1 pode ocorrer na presença ou na ausência de outra doença causada por este vírus (VERNAN et al., 1988).

2.6 EPIDEMIOLOGIA DO HTLV

Estima-se que aproximadamente 15 a 20 milhões de pessoas estão infectadas pelo HTLV em todo o mundo (PROIETTI et al., 2005; GESSAIN; CASSAR, 2012). Algumas áreas são endêmicas para esta infecção, incluindo sudoeste do Japão (Kyushu, Shikoku e Okinawa), África subsaariana, regiões do Caribe, Irã e Melanésia. No Brasil, estima-se que aproximadamente 2,5 milhões de pessoas estejam infectadas pelo HTLV-1 (Figura 4) (BLATTNER et al., 1982; HANCHARD et al., 1990; YAMAGUCHI, 1994; GESSAIN; de THÉ, 1996; MUELLER et al., 1996; CATALAN-SOARES; PROIETTI, 2004). As taxas de soroprevalência diferem de acordo com a região geográfica (Quadros 1 e 2), composição étnica, racial e sociodemográfica da população estudada, além dos comportamentos de risco individuais.

FIGURA 4 - DISTRIBUIÇÃO DO HTLV-1 NO MUNDO



FONTE: PROIETTI et al. (2005).

2.6.1 HTLV-1/2 no mundo

O Japão foi a primeira região da Ásia a ser identificada como endêmica para o HTLV, com taxas de prevalência que variam de 0% a 37%, sendo as áreas localizadas no sudoeste do país (Shikoku, Kyushu e Okinawa), as que apresentam maiores índices para o HTLV (HINUMA, 1982; KAJIYAMA et al., 1986b).

No ano de 2004 foi realizado um estudo com gestantes no Japão e encontrou-se uma prevalência de 3,9% (MAEHAMA, 2004). Dez anos depois, outro estudo no Japão, demonstrou uma prevalência de 0,1% numa amostra de 33.617 gestantes. Esta tendência de redução no número de gestantes infectadas pelo HTLV, segundo o autor, se dá devido a algumas ações que foram adotadas em relação ao aconselhamento referente à amamentação, reduzindo o risco na transmissão vertical, além da disponibilidade de fórmulas lácteas. Também deve-se considerar o aumento no número de trabalhadoras do sexo feminino, diminuindo o tempo de amamentação (YAMADA et al., 2014).

Na Inglaterra, em estudo com gestantes, obteve-se uma prevalência de 0,04% para HTLV-1 (ADES et al., 2000). Na Itália, esse índice foi de 0,02% (TAYLOR et al., 2005). Na África, o HTLV-2 foi encontrado entre pigmeus, em uma proporção de 2,05% e em Camarões, em uma proporção de 1,18% (MAUCLÈRE et al., 1997). Nos Estados Unidos, a taxa de soroprevalência no grupo de doadores de sangue foi de 0,016%, havendo um predomínio de mulheres entre os infectados, pessoas de origem caribenha e pessoas que possuem parceiros sexuais de áreas endêmicas para o HTLV. No Chile, a taxa foi de 0,73% na população de doadores de sangue e, na Argentina, as taxas para este grupo foram de 0,8% (SANCHEZ; VÁZQUEZ, 1991; HJELLE et al., 1992, BIGLIONE et al., 1997). Nos índios Mayas no México, foi encontrada a prevalência de 0,23% para o HTLV-2 (GONGORA BIACHI et al., 1997) e em ameríndios da Costa Rica, a prevalência foi de 8% (VISONÁ et al., 1997).

No Quadro 1 estão descritas as prevalências encontradas em trabalhos realizados em algumas regiões do mundo, como na África, Índia Ocidental, Ásia, Europa e América do Sul. Pode-se observar que os continentes com maior prevalência são a África, com uma prevalência que varia de 2,1 em Gana a 5,5 na

Nigéria, e na América do Sul, variando de 0,1 na Argentina a 4,2 na Guiana Francesa.

QUADRO 1 - PORCENTAGEM DE SOROPOSITIVIDADE PARA O HTLV-1/2 EM AMOSTRAS DE GESTANTES E PUÉRPERAS EM ESTUDOS MUNDIAIS

REGIÃO	LOCAL	PREVALÊNCIA (%)	AUTOR/ANO
África	Guiné Bissau	2,2	Andersson et al.,1997
	Gana	2,1	Armah et al.,2006
	Nigéria	5,5	Olaleye et al.,1995
	Zaire	4,6	Goubau et al.,1993
América Central	Martinique	2,4	Denis et al.,1988
	Jamaica	3,8	Maloney et al.,2006
	Haiti	2,2	Allain et al.,1992
Ásia	Japão	3,7	Hino et al.,1985
	Japão	3,9	Maehama,2004
	Japão	0,1	Yamada et al.,2014
Europa	Inglaterra	0,04	Ades et al.,2000
	França	0,1	Courtois et al.,1990
	Itália	0,02	Taylor et al.,2005
América do Sul	Guiana Francesa	4,2	Tortevoye et al.,2005
	Peru	1,3	Alarcon et al.,2006
	Argentina	0,1	Trenchi et al.,2007

Fonte: Adaptado de GESSAIN; CASSAR (2012).

2.6.2 Epidemiologia no Brasil

É provável que o HTLV-1 tenha vindo para o Brasil através da população ameríndia nativa, do tráfico de escravos na época colonial e da imigração japonesa no início do século XX. Já o HTLV-2 é endêmico entre populações indígenas nativas das Américas, sendo detectado na região norte brasileira, entre índios Kaiapós, em uma proporção de 42% entre filhos de mães positivas. A análise filogenética do HTLV-2 demonstra a presença do vírus entre esses índios, o qual tem se disseminado para a população não indígena do norte do Brasil e também para o México (NOVOA et al., 1997).

O primeiro caso da associação de leucemia de células T e HTLV-1 no Brasil foi relatado em 1990 (POMBO DE OLIVEIRA et al., 1990). Os primeiros casos de

MAH/PET no Brasil foram descritos em 1989 no Ceará e em São Paulo, sendo posteriormente descrito em outras regiões do país (CASTRO-COSTA, 1989; MARTINS-CASTRO et al., 1989; ARAÚJO, 1993; CAVALCANTI, 1993; LESSA et al., 1993; MOREIRA et al., 1993). O Brasil configura-se como uma área endêmica para o HTLV-1 com variações regionais (CATALAN-SOARES; PROETTI, 2004). A triagem sorológica para HTLV-1/2, obrigatória em hemocentros no Brasil, foi introduzida em 1993 por meio da Portaria n.º 1376 do Ministério da Saúde, seguida pela Portaria n.º 2135 de 1994 e RDC n.º 153 de 2004 (BRASIL, 1993; BRASIL, 1994; ANVISA, 2004).

Foram realizados estudos no grupo de doadores de sangue, em diferentes cidades brasileiras (Quadro 2), demonstrando que a prevalência da infecção neste grupo variou de 0,03% em Patos de Minas (MG) e Maringá (PR), a 1,35% em Salvador (BA).

QUADRO 2 - PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS HTLV-1/2 NO BRASIL ENTRE DOADORES DE SANGUE

LOCAL	n.º TOTAL	PREVALÊNCIA (%)	ANO DO ESTUDO	AUTOR (ANO)
Rio Branco – AC	11.121	0,66	1998 a 2001	Colin et al. (2003)
Ceará – CE	679.610	0,05	2001 a 2008	Gomes; Junior (2011)
Maranhão – MA	365.564	0,15	2003 a 2009	Viana et al. (2014)
Piauí – PI	233.927	0,17	2008 a 2013	Oliveira et al. (2015)
Patos de Minas – MG	39.127	0,03	2002 a 2011	Braga et al. (2012)
Salvador – BA	104.835	0,40	2000 a 2003	Mota et al. (2006)
Salvador – BA	1.040	1,35	1993	Galvão-Castro et al. (1997)
Caruaru – PE	61.881	0,10	2006 a 2010	De Lima et al. (2013)
Belo Horizonte – MG	422.600	0,10	1993 a 2004	Namen-Lopes et al. (2009)
Ribeirão Preto – SP	301.470	0,10	2000 a 2010	Tomazini et al. (2012)
São Paulo – SP	17.063	0,18	1991 a 1993	Ferreira Júnior et al. (1995)
Rio de Janeiro – RJ	2138	0,40	1989	Lee et al. (1989)
Maringá – PR	8.337	0,03	2011	Borelli et al. (2013)
Porto Alegre – RS	197.032	0,11	1998 a 2008	Garcia et al. (2011)

FONTE: KILPP (2015).

LEGENDA: AC – Acre; CE – Ceará; MA – Maranhão; PI – Piauí; MG – Minas Gerais; BA – Bahia; PE – Pernambuco; SP – São Paulo; RJ – Rio de Janeiro; PR – Paraná; RS – Rio Grande do Sul.

Estudos de prevalência em outros grupos foram relatados por Catalan-Soares e colaboradores (2001). No Quadro 3, pode ser observado que os imigrantes japoneses apresentam uma taxa de anticorpos anti-HTLV 1/2 elevada, variando de 6,8% a 10,4%, sendo uma das áreas de maior prevalência do mundo (KITAGAWA et al., 1986).

Em pacientes hemofílicos, foi relatada a presença de anticorpos anti-HTLV com taxas que variaram de 3,6% a 4,9% (CARNEIRO-PROIETTI et al., 1998; CORTES et al., 1989) e, nos politransfundidos, de 9% a 12%, confirmando que a via de maior índice de transmissão é a parenteral (FARIAS DE CARVALHO et al., 1997; POMBO DE OLIVEIRA, 1997). Pacientes com neoplasias apresentaram taxa de 23,3% (NAKAUCHI et al., 1990) e pacientes com doenças linfoproliferativas, taxas de 3,7% a 28,9% (ANDRADA-SERPA et al., 1989; FARIAS DE CARVALHO et al., 1997), demonstrando que o HTLV é um vírus oncogênico. Outro grupo de risco investigado foram os usuários de droga que tiveram um índice de 9,7% a 25,3%, confirmando novamente a transmissão pela via parenteral (DOURADO et al., 1997).

Também se observou uma elevada frequência na transmissão horizontal e vertical entre familiares de portadores assintomáticos do HTLV-1/2, a qual, conforme apresentado no Quadro 3, foi de 27,5% (FARIAS DE CARVALHO et al., 1997).

QUADRO 3 - PREVALÊNCIA DA INFECÇÃO DO HTLV NO BRASIL

(continua)

Grupo estudado (local do estudo)	n	HTLV 1/2 (%)	Fonte
Imigrantes japoneses	147	10 (6,8)	Kitagawa et al., 1986
De Okinawa	96	10 (10,4)	
De outras partes	51	0 (0,0)	
Pacientes de risco para retrovíruses Hemofílicos (RJ, SP e MG)	548 ND	20 (3,6) (13,0)	Cortes et al., 1989
Pacientes com doenças malignas (RJ)	215	8 (3,7)	Andrada Serpa et al., 1989
Comunidades Indígenas da Amazônia Índios com câncer (Belém, PA)	137 43	43 (31,5) 10 (23,3)	Nakauchi et al., 1990
Pacientes com distúrbios neurológicos (SP)	150	46 (30,7)	
Pacientes com LTA (RJ)	14	11 (78,6)	Pombo de Oliveira et al., 1990
Pacientes com mielopatia não-traumática, não-tumoral (Salvador, BA)	43	9 (20,9)	Meireles et al., 1992
Índios de 13 tribos (AM, PA e MT)	624	109 (17,5)	Maloney et al., 1992
Gestantes (Belo Horizonte, MG)	1500	17 (1,1)	Andrade et al., 1996
Pacientes com mielopatia de etiologia desconhecida (BA)	62	17 (27,4)	Andrade Filho et al., 1996
Doadores de sangue			Galvão-Castro et al., 1997
Manaus	1200	1 (0,8)	
Recife	1200	4 (0,33)	
Salvador	1040	14 (1,35)	
Rio de Janeiro	1200	4 (0,33)	
Florianópolis	1200	1 (0,08)	
Pacientes com doença linfoproliferativa	152	44 (28,9)	Farias de Carvalho et al., 1997
Doadores de sangue	ND	(0,4)	
Politransfundidos	ND	(0,1)*	
Familiares de infectados pelo HTLV-1/2	351	36 (10,3)	
	109	30 (27,5)	

QUADRO 3 - PREVALÊNCIA DA INFECÇÃO DO HTLV NO BRASIL (conclusão)			
Índios Kaiapós (Filhos de mães positivas para HTLV-1/2)	141	59 (41,8)*	Novoa et al., 1997
Doadores	ND	(0,5 a 1,8)	Pombo de Oliveira, 1997
Politransfundidos	ND	(9,0 a 12,0)	
Co-infetados com HIV (locais variados)	ND	(6,3)	
Usuários de drogas endovenosas (Salvador, BA)	217	55 (25,3) 21 (9,7) *	Dourado et al., 1997
Doadores de sangue (RN)	47078	28 (0,1)	Cavalcanti Jr. et al., 1997 Fundação Hemominas, 1998
Doadores de sangue (Belo Horizonte, MG)	95.823	58 (0,1)	
Hemofílicos (Belo Horizonte, MG)	226	11 (4,9)	Carneiro Proietti et al., 1998
Pacientes com lupus eritematoso sistêmico	33	0 (0,0)	Lorenzetti et al., 1999
Artrite reumatoide (Porto Alegre, RS)	69	4 (5,8)	
Gestantes (Salvador, BA)	6754	53(0,8) HTLV1 2(0,1) *HTLV2	Bittencourt, 1998

FONTE: Adaptado de CATALAN-SOARES; PROIETTI; CARNEIRO PROIETTI; 2001.

LEGENDA: *HTLV-II; ND - informação não disponível; RJ – Rio de Janeiro; SP – São Paulo; MG – Minas Gerais; PA – Pará; AM – Amazonas; MT – Mato Grosso; RN – Rio Grande do Norte.

No grupo de gestantes estudado, pode-se observar uma prevalência que varia de 0,076% em Minas Gerais (RIBEIRO et al., 2010), 0,1% em Botucatu, São Paulo, até 1,3% em Vitória, Espírito Santo (PROIETTI et al., 2015). A variação nas taxas em regiões diferentes pode ser devida a desigualdades no tamanho das amostras e/ou metodologia empregada, bem como à diferença de etnias nas populações estudadas, conforme demonstrado no Quadro 4.

Algumas regiões possuem programas de pré-natal que estão incluindo o exame HTLV-1/2, como o Programa de Proteção à Gestante do Estado de Mato Grosso do Sul (FIGUEIRÓ-FILHO et al., 2005), e em Minas Gerais, um Grupo de Pesquisadores da Fundação Hemominas, tem demonstrado a importância da inclusão no pré-natal (PROIETTI, 2015).

Em estudo realizado em Salvador, Bahia, a avaliação epidemiológica das gestantes portadoras do vírus, possibilitou concluir que a infecção foi adquirida principalmente por meio da amamentação. Um percentual de 15,6% delas referiu a presença de eczema na infância, doença também denominada dermatite infecciosa associada ao HTLV-1, enquanto no grupo controle de gestantes HTLV-1 negativas, apenas 0,85% apresentaram eczema (BITTENCOURT et al., 2001).

QUADRO 4 - PORCENTAGEM DE SOROPOSITIVIDADE PARA O HTLV-1/2 EM AMOSTRAS DE GESTANTES, PUÉRPERAS E NEONATOS EM ESTUDOS BRASILEIROS

LOCAL	n. ^o TOTAL	PREVALÊNCIA (%)	MÉTODO	ANO DO ESTUDO	AUTOR/ANO DA PUBLICAÇÃO
Campo Grande-MS	32.512	0,10	EIA/WB/PCR	2002 a 2003	Figueiró-Filho et al., 2007
Mato Grosso do Sul	116.689	0,13	EIA/WB/PCR	2002 a 2005	Dall Fabro et al., 2008
Mato Grosso do Sul	155.807	0,13	Papel Filtro/EIA/WB	2002 a 2006	Portela, 2008
Mato Grosso	2.985	0,20	EIA/WB	2006	Ydy et al., 2009
Cruz das Almas-BA	408	0,98	EIA/WB	2005	Magalhães et al., 2008
Bahia	2.766	1,05	EIA/WB/PCR	2008 a 2010	Mello et al., 2014
Bahia	6.754	0,84	EIA/WB/PCR	1996 a 1998	Bittencourt et al., 2001
Fortaleza – CE	814	0,12	EIA/WB	1993 a 1994	Broutet et al., 1996
Minas Gerais	55.293	0,08	Papel filtro/WB	2009	Ribeiro et al., 2010
Espírito Santo	534	1,30	EIA	1999	Lima; Viana, 2009
Belo Horizonte – MG	1.500	1,10	EIA/WB	1995	Andrade et al., 1996
Goiás	15.485	0,10	EIA/PCR	2003 a 2004	Oliveira; Avelino, 2006
São Paulo	913	0,10	EIA/WB	2004	Olbrich Neto; Meira, 2004
São Luis-MA	2.044	0,30	EIA/WB/PCR	2008	Souza et al., 2012
Pará	13.382	0,32	DSB/WB	2008	Sequeira et al., 2012
Rio de Janeiro	1.204	0,66	CMIA/WB	2012 a 2013	Monteiro et al., 2014

FONTE: O autor (2016).

LEGENDA: MS – Mato Grosso do Sul; BA – Bahia; CE – Ceará; MG – Minas Gerais; MA – Maranhão; EIA – Ensaio Imunoenzimático; WB – Western Blot; PCR – Reação em Cadeia da Polimerase; DSB – Papel filtro; CMIA – Imunoensaio de quimioluminescência.

No Quadro 5, abaixo, são apresentados resultados de prevalência entre os grupos de banco de sangue e de gestantes, de acordo com os estados brasileiros. Observa-se que a prevalência variou de 0,08 em Minas Gerais a 1,05% na Bahia, no grupo de gestantes. No grupo de banco de sangue, a prevalência variou de 0,03% em Minas Gerais e Paraná a 0,40% na Bahia e Rio de Janeiro. Também pode ser observado que no grupo das gestantes as taxas expressas em porcentagem apresentaram-se maiores e que, no Paraná, estes dados não são relatados.

QUADRO 5 -PORCENTAGEM DE SOROPOSITIVIDADE PARA O HTLV-1/2 EM AMOSTRAS DE GESTANTES, PUÉRPERAS E BANCOS DE SANGUE EM ESTUDOS BRASILEIROS

ESTADO	PREVALÊNCIA (%) GESTANTES	PREVALÊNCIA (%) BANCO DE SANGUE	AUTOR, ANO
Ceará	0,12	0,05	Broutet et al., 1996 Gomes; Junior, 2011
Maranhão	0,30	0,15	Souza et al., 2012 Viana et al., 2014
Minas Gerais	0,08	0,03	Ribeiro et al., 2010 Braga et al., 2012
Bahia	1,05	0,40	Mello et al., 2014 Mota et al., 2006
São Paulo	0,10	0,10	Olbrich Neto; Meira, 2004 Tomazini et al., 2012
Rio de Janeiro	0,66	0,40	Monteiro et al., 2014 Lee et al., 1989
Paraná	NR	0,03 – 0,08	Borelli et al., 2013 Kilpp et al., 2015

FONTE: O autor (2016).

LEGENDA: NR - Não relatado.

2.6.3 Epidemiologia no estado do Paraná

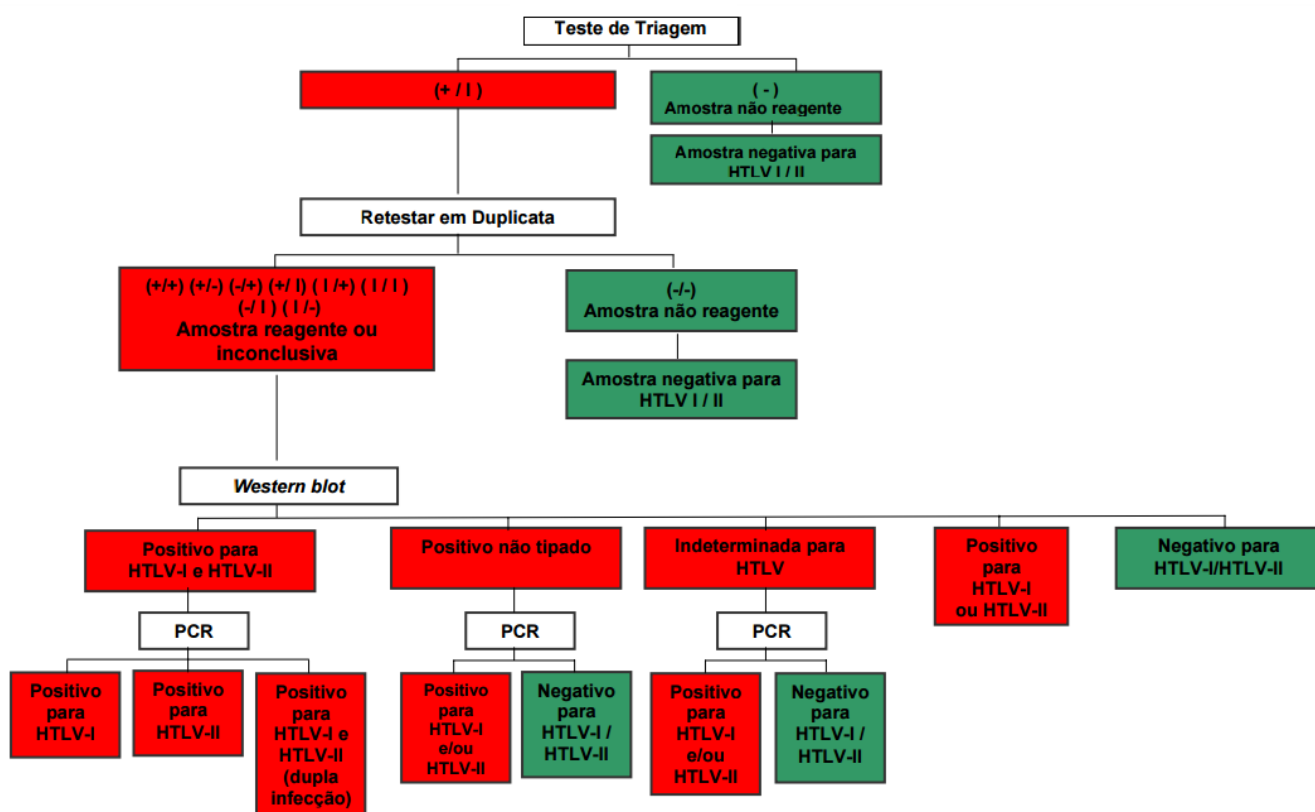
No Paraná, são poucos os dados disponíveis, havendo estudos apenas entre doadores de sangue. Nestes, foi encontrada a prevalência de HTLV-1/2 de 0,01% e 0,7%, respectivamente (PEREIRA; BONAFÉ, 2015; RAMOS; FERRAZ, 2010).

Entre os anos de 1994 a 2015 foi contabilizado um total de 865.731 doadores de sangue no Biobanco (CHC-UFPR) e Hemobanco da cidade de Curitiba. Destes, 0,09% apresentaram sorologia reagente para HTLV-1/2 por método imunoenzimático (KILPP, 2015). Em estudo retrospectivo realizado no Biobanco do CHC-UFPR, no período de 2000 a 2008, com o objetivo de identificar doadores com sorologias positivas para HBV, HCV, HIV e HTLV, foi observada uma taxa de 0,08% de doadores com resultados reagentes para HTLV (SATO, 2008). Não foram encontrados, até o momento, estudos envolvendo gestantes e prevalência do HTLV.

2.7 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Para o diagnóstico laboratorial utilizam-se o ensaio imunoenzimático (EIA) e como testes confirmatórios o *Western Blot* (WB) e a PCR (CATALAN-SOARES; PROIETTI; CARNEIRO-PROIETTI, 2001; COLIN et al., 2003). A PCR, que detecta o DNA proviral, tem sido utilizada como teste confirmatório, para diferenciação entre o HTLV-1 e o HTLV-2. O algoritmo recomendado pelo Ministério da Saúde, para o diagnóstico de triagem e confirmatório do HTLV, está ilustrado abaixo (Figura 5).

FIGURA 5 - TESTE DE TRIAGEM E CONFIRMATÓRIO DO HTLV – ALGORITMO



FONTE: MINISTÉRIO DA SAÚDE (2004).

NOTA: Algoritmo para o diagnóstico laboratorial do HTLV-1/2, usando um teste de triagem e *Western Blot* ou PCR como teste confirmatório.

LEGENDA: + (Reagente); - (Não Reagente); I (Inconclusivo).

2.7.1 Testes de triagem

Os métodos imunoenzimáticos (EIA) são testes que utilizam enzimas como sistema de detecção. A interação antígeno-anticorpo é evidenciada pela ação de uma enzima e o substrato apropriado, e revelada por um cromógeno.

Os antígenos mais utilizados são: lisado viral (proteínas obtidas de partículas virais, contendo antígenos naturais); peptídeo sintético (pequenas sequências de 15 a 40 aminoácidos, sintetizados quimicamente em laboratório); proteínas recombinantes sintetizadas em organismos vivos (bactérias ou fungos) que foram geneticamente modificados pela adição de um fragmento de DNA do HTLV-1/2. As enzimas utilizadas são a fosfatase alcalina e a peroxidase, e os cromógenos mais usados são a ortofenileno diamina (OPD) ou a tetrametil benzidina (TMB). A cor resultante da ação da enzima deve ser lida em comprimento de onda de 405 a 492 nm.

O diagnóstico sorológico da infecção pelo HTLV consiste na detecção de anticorpos específicos, por meio de testes como QMIA e WB (CONSTATINE et al., 1992). Ambos os ensaios de triagem e o teste complementar de WB detectam anticorpos contra os produtos dos genes *env* e *gag* do HTLV-1 e HTLV-2. Entretanto, estudos têm demonstrado que o WB pode frequentemente falhar na detecção de anticorpos contra os produtos do gene *env*. Algumas amostras podem ter resultado positivo no WB, mas sem diferenciação entre o HTLV-1 e HTLV-2, sendo consideradas não-tipadas. Nesses casos, para que se obtenha um diagnóstico mais seguro e específico, é necessária uma combinação de testes, como a detecção molecular por meio da PCR (LAL et al., 1992; LEE et al., 2004; LI; GREEN, 2007; ALTAMIRANO et al., 2010).

2.7.2 Testes complementares

O processo diagnóstico da infecção pelo HTLV se baseia na detecção de anticorpos anti-HTLV circulantes no sangue. Geralmente, o processo se inicia

através da realização do método EIA. Apesar da sensibilidade elevada, o valor preditivo positivo do teste pode ser baixo se a população testada apresentar baixa prevalência da infecção (THORSTENSSON; ALBERT; ANDERSSON, 2002). Para confirmação do diagnóstico, é recomendada, portanto, a realização de um teste complementar em casos que apresentem resultados reagentes pelo método de EIA (ANDERSON et al., 1989; POIESZ et al., 2000; THORSTENSSON; ALBERT; ANDERSSON, 2002; GIBELLINI et al., 2003; COSTA et al., 2009). Além de confirmar o diagnóstico, os exames complementares também irão diferenciar entre HTLV-1 e HTLV-2 e descartar casos falso-positivos. As combinações tornam a sensibilidade e especificidade mais confiáveis. Dentre estes testes, os mais utilizados são o WB e a PCR (POIESZ et al., 2000; BERINI et al., 2008; FURUTA et al., 2015). A sensibilidade do WB para identificação do HTLV-1 se mostrou elevada em vários estudos com taxas de 92,3% a 100% (GALLO et al., 1994; THORSTENSSON; ALBERT; ANDERSSON, 2002; COSTA; MAGRI; CATERINO-DE-ARAUJO, 2011), enquanto a especificidade variou de 86% a 97,5% (GALLO et al., 1994; VARMA et al., 1995). Com relação ao HTLV-2, a sensibilidade do WB variou entre 73% e 85%, enquanto que a especificidade foi de 100% (COSTA; MAGRI; CATERINO-DE-ARAUJO, 2011; POIESZ et al., 2000; THORSTENSSON; ALBERT; ANDERSSON, 2002).

O WB é um teste imunoenzimático que utiliza membrana de nitrocelulose como fase sólida e detecta anticorpos contra proteínas virais específicas. Os conjuntos diagnósticos atualmente disponíveis para HTLV-1/2 possuem tiras com uma combinação das seguintes proteínas virais (nativas ou recombinantes): rgp21 ou GD21 ou p21, p19, p24, p26, p28, p32, p36, p38, p42, gp46, p53, rgp 46-I e rgp 46-II. Recomenda-se que o conjunto diagnóstico de WB tenha na sua configuração antigênica além do lisado viral, proteínas recombinantes ou peptídeos sintéticos capazes de fazer a discriminação entre os dois tipos virais. As proteínas recombinantes discriminatórias são: rgp 46-I para o HTLV-1 e rgp 46-II para o HTLV-2. A rgp-21, comum aos dois tipos virais, também é denominada p21 ou GD21, dependendo do conjunto diagnóstico. Apesar da alta sensibilidade e especificidade deste teste, existe a possibilidade de ocorrência de resultados indeterminados, necessitando por vezes de um segundo teste complementar para confirmar o diagnóstico (ANDERSON et al., 1989; BLUMER et al., 1992; CENTERS FOR

DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 1989, 1993). As razões para a ocorrência de resultados indeterminados ainda são incertas. No entanto, algumas hipóteses foram levantadas e incluem reações cruzadas com outros retrovírus ou outros tipos de vírus, reação cruzada com malária, mutações de HTLV, baixa carga proviral do HTLV e infecção pelo HTLV-2 (ABRAMS; AKAHATA; JACOBSON, 2011; RAFATPANAH et al., 2013).

O uso da PCR amplifica sequências específicas do genoma viral diretamente do sangue. Esta reação apresenta maior sensibilidade e especificidade que os métodos sorológicos, uma vez que neste método não há necessidade de presença de anticorpos, sendo, por esse motivo, a identificação do vírus precoce. Além disso, ele faz a diferenciação do HTLV-1 e HTLV-2 (PANCAKE et al., 1996). A PCR em tempo real também permite melhorar a acurácia dos resultados, abrindo novas perspectivas sobre seu uso na prática clínica. Alguns estudos mostram que a sensibilidade do método de PCR em tempo real é de 100% e especificidade de 96,7 a 100% (ANDRADE et al. 2010; GALLO et al., 1994; POIESZ et al., 2000; THORSTENSSON; ALBERT; ANDERSSON, 2002; ROSADAS et al., 2013). Estudos que analisaram a sensibilidade comparativamente pelo tipo de vírus demonstram que a PCR em tempo real apresentou sensibilidade de 84,6% a 94,2% para o HTLV-1 e 76,9% a 90,7% para o HTLV-2 (THORSTENSSON; ALBERT; ANDERSSON, 2002; COSTA; MAGRI; CATERINO-DE-ARAUJO, 2011; LEE; AHN, 2011; ESTES; SEVALL, 2003). Os motivos para a ocorrência de falso-negativos incluem a baixa carga viral, uso de antirretrovirais e imunossupressão importante.

A PCR é utilizada como teste confirmatório, mas devido à sua complexidade de execução, geralmente é realizado em conjunto com o WB, caso este apresente resultado indeterminado. Como as metodologias para a execução em sua maioria são *in house*, para os laboratórios que já possuem a estrutura necessária, a utilização da PCR como primeiro teste confirmatório poderia trazer uma redução importante dos custos. Finalmente, a capacidade de quantificação da carga pró-viral faz com que a PCR possa ter papel importante na avaliação da correlação da infecção com o desenvolvimento de manifestações clínicas (LEE et al., 2004; LI; GREEN, 2007; ALTAMIRANO et al., 2010). A comunicação do diagnóstico do HTLV, mesmo em casos assintomáticos, pode estar associada a transtornos de humor, podendo gerar depressão, havendo em alguns casos necessidade de

acompanhamento. Isso reforça a necessidade do diagnóstico confirmatório, antes da comunicação do resultado (DE ALMEIDA et al., 2015).

3 JUSTIFICATIVA

A epidemiologia do HTLV ainda é pouco conhecida no Estado do Paraná, onde já foram diagnosticados casos de PET. Além disso, foi demonstrada uma taxa de 0,08% de doadores soropositivos para HTLV (SATO, 2008). Programas de triagem neonatal são uma estratégia muito importante para reduzir as infecções para o recém-nato e pelos lactentes no caso do HTLV. Neste contexto, fornecer um diagnóstico acurado e preciso é necessário para auxiliar o clínico e os serviços de saúde para a adoção de medidas de aconselhamento, prevenção e qualidade de vida, aos portadores ou pacientes que já desenvolveram doenças devido ao HTLV. Estudos já comprovaram que o aconselhamento em relação à amamentação pode reduzir a taxa de transmissão em cerca de 3% (TSUJI et al., 1990; KASHIWAGI et al., 2004). No Brasil, de acordo com o algoritmo preconizado pelo Ministério da Saúde, a testagem do HTLV-1/2 se baseia na triagem sorológica utilizando-se métodos imunoenzimáticos. Sendo estes positivos, as amostras serão submetidas aos testes confirmatórios por meio de *Western Blot* e técnicas de biologia molecular. Estas técnicas fundamentam-se primariamente na detecção do ácido nucleico viral na forma de DNA proviral. O HTLV não apresenta viremia plasmática, essa característica faz da procura do DNA proviral o método de escolha e mais adequado para o diagnóstico molecular do HTLV (PANCAKE et al., 1996).

A padronização de um fluxograma para o diagnóstico clínico e laboratorial de alta sensibilidade e especificidade analíticas é primordial para demonstrar o real impacto do vírus nesta população, reduzindo a transmissão vertical, por meio da utilização de métodos que possam concluir o diagnóstico.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a prevalência da infecção pelo HTLV em gestantes de pré-natal do ambulatório de alto risco do Serviço de Tocoginecologia do CHC-UFPR.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Detectar a presença de anticorpos anti-HTLV por meio do método de QMIA.
- b) Padronizar e confirmar por método molecular a pesquisa das regiões genômicas do HTLV (*tax* e *pol*).
- c) Confirmar por métodos moleculares as amostras reagentes nos testes de triagem.
- d) Obter dados epidemiológicos para nortear o encaminhamento quanto ao aleitamento materno de lactentes de mães HTLV positivas.

5 MATERIAL E MÉTODOS

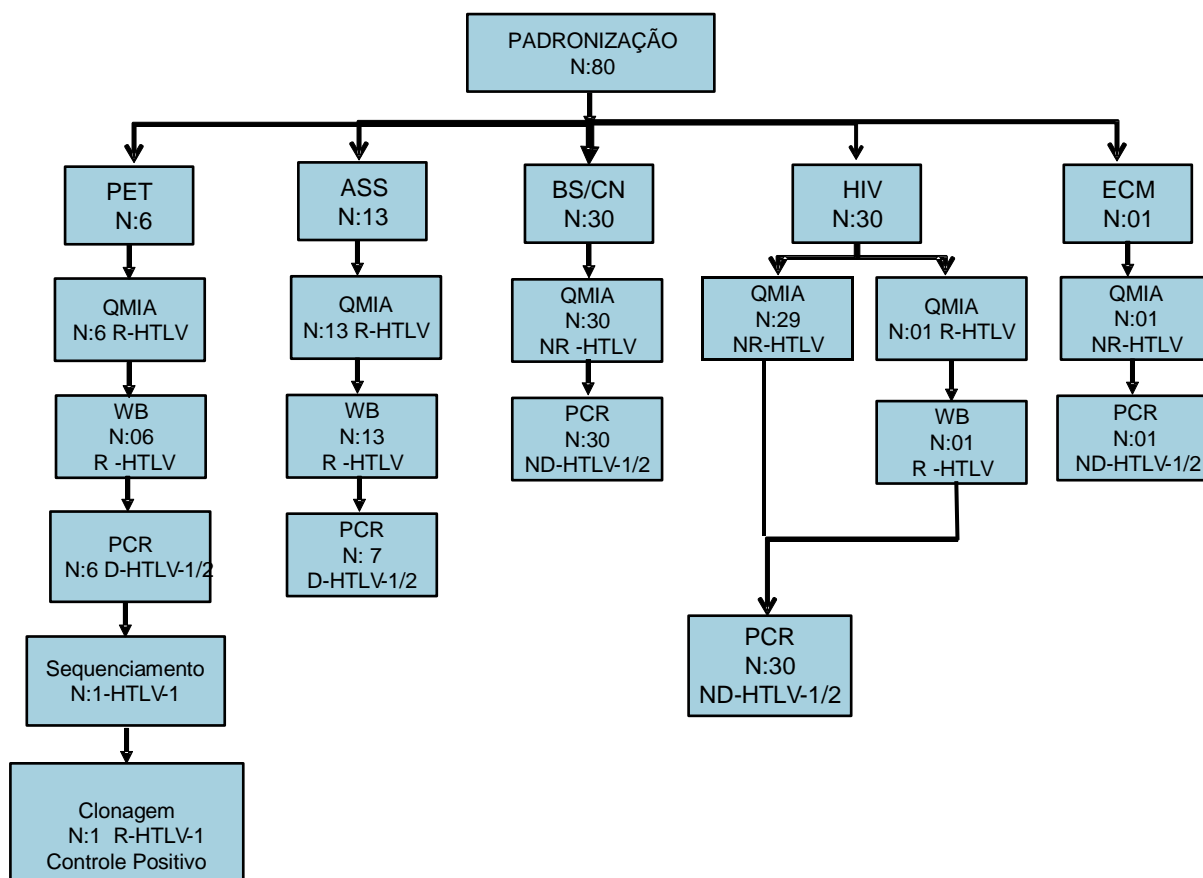
Trata-se de um estudo descritivo de corte transversal prospectivo, tendo como objetivo avaliar a prevalência da infecção pelo HTLV em gestantes de alto risco que procuraram o serviço de pré-natal do Complexo Hospital de Clínicas da UFPR (CHC-UFPR), no período de agosto de 2015 a agosto de 2016. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Seres Humanos do CHC-UFPR sob o número 14058113000000096 (Anexo 1), com registro no BANPESQ número 2015017623.

5.1 CASUÍSTICA

5.1.1 Padronização do método molecular

Para a etapa da padronização dos métodos moleculares, foram selecionadas 80 amostras divididas em grupos: 1- Pacientes com diagnóstico clínico de PET acompanhados no ambulatório de Neuroinfecção do CHC-UFPR (n= 6); 2- Indivíduos portadores assintomáticos de HTLV acompanhados no ambulatório de Neuroinfecção do CHC-UFPR (n= 13); 3- Grupo controle negativo: doadores de sangue do BIOBANCO CHC-UFPR (n= 30); 4- Indivíduos com diagnóstico de HIV (n= 30); 5- Indivíduos com diagnóstico de esclerose múltipla atendidos no Ambulatório de Neurologia do CHC-UFPR (n= 1) (Figura 6). Estes pacientes já faziam parte do banco de dados de grupo controle de outros projetos ou eram pacientes acompanhados em ambulatórios específicos.

FIGURA 6 - FLUXOGRAMA UTILIZADO PARA A PADRONIZAÇÃO DOS MÉTODOS MOLECULARES



FONTE: O autor (2016).

LEGENDA: D - Detectado; ND - Não Detectado; R - Reagente; ASS - Assintomático; BS - Banco de Sangue; ECM - Esclerose Múltipla.

5.1.2 Gestantes de alto risco

No período de agosto de 2015 a agosto de 2016, foram estudadas 643 gestantes de alto risco acompanhadas no ambulatório de pré-natal do serviço de Tocoginecologia.

As gestantes de alto risco, segundo os critérios do Ministério da Saúde são aquelas que apresentam os seguintes critérios:

1- Características individuais e condições sócio-demográficas desfavoráveis: idade maior que 35 anos; idade menor que 15 anos ou menarca há menos de 2 anos;

altura menor que 1,45 m; peso pré-gestacional menor que 45 kg e maior que 75 kg (IMC 30); anormalidades estruturais nos órgãos reprodutivos; situação conjugal insegura; conflitos familiares; baixa escolaridade; condições ambientais desfavoráveis; dependência de drogas lícitas ou ilícitas; hábitos de vida – fumo e álcool; exposição a riscos ocupacionais, como esforço físico, carga horária elevada, rotatividade de horário, exposição a agentes físicos, químicos e biológicos nocivos, estresse.

2- História reprodutiva anterior: abortamento habitual; morte perinatal explicada e inexplicada; história de recém-nascido com crescimento restrito ou malformado; parto pré-termo anterior; esterilidade/infertilidade; intervalo interpartal menor que dois ou maior que cinco anos; nuliparidade e grande multiparidade; síndrome hemorrágica ou hipertensiva; diabetes gestacional; cirurgia uterina anterior (incluindo duas ou mais cesáreas anteriores).

3- Condições clínicas preexistentes: hipertensão arterial; cardiopatias; pneumopatias; nefropatias; endocrinopatias (principalmente diabetes e tireoidopatias); hemopatias; epilepsia; doenças infecciosas; doenças autoimunes; ginecopatias; neoplasias (BRASIL, 2010).

5.1.3 Coleta de dados e amostras

A coleta de dados foi realizada pelo pesquisador e colaboradores do projeto no ambulatório de pré-natal da maternidade do CHC-UFPR. Na primeira consulta foi solicitada a pesquisa de anticorpos para HTLV-1/2 e os exames de rotina do pré-natal. A coleta de sangue foi realizada por punção venosa. Procedeu-se a pesquisa de anticorpos anti-HTLV, por meio do método de QMIA (laboratório de imunoquímica do CHC-UFPR). As pacientes com resultado reagente foram submetidas a um novo teste de quimioluminescência. Sendo este reagente, foi realizada a coleta de cerca de 10 mL de sangue com EDTA para a reação de PCR, de acordo com o protocolo preconizado pelo Ministério da Saúde/Departamento de DST/AIDS e Hepatites Virais (2016). Os dados obtidos foram tabulados, incluindo os fatores sócio-demográficos,

epidemiológicos e a infecção pelo HTLV como variável dependente, procurando identificar possíveis associações entre a positividade do teste e as respostas obtidas. Os dados demográficos, epidemiológicos, clínicos, laboratoriais e a evolução clínica das pacientes foram pesquisados por meio de revisão de prontuário e entrevista, registrados em questionário específico (Apêndice 2).

5.1.4 Critérios de inclusão

- a) Pertencer ao grupo de gestantes em acompanhamento no ambulatório de pré-natal do Serviço de Tocoginecologia do CHC-UFPR;
- b) Assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), descrito no Apêndice 1.
- c) Responder a um questionário padronizado em entrevista individual, com dados demográficos e epidemiológicos;
- d) Submeter-se à realização do teste de QMIA para HTLV-1/2 e, se reagente, ao teste confirmatório por PCR.

5.1.5 Critérios de exclusão

Pacientes que recusaram a assinar o TCLE e que não aceitaram responder a ficha questionário e/ou se submeter à realização do teste de QMIA para HTLV.

5.2 MÉTODOS LABORATORIAIS UTILIZADOS

Para a investigação do estado sorológico das amostras incluídas no estudo (grupos da padronização do método molecular e gestantes; Figura 6 e 7 respectivamente), utilizou-se o método de QMIA e como testes confirmatórios o WB

e a PCR (CATALAN-SOARES; PROIETTI; CARNEIRO-PROIETTI, 2001; COLIN et al., 2003; COSTA et al., 2011). As seguintes etapas foram realizadas: Etapa I – Triagem sorológica utilizando o teste QMIA; Etapa II – Confirmação sorológica pelo método de Western Blot (realizado nas amostras da padronização) para HTLV-1/2; Etapa III – Confirmação da infecção pelo HTLV 1/2, por meio da PCR (realizada nas 80 amostras da fase de padronização dos métodos moleculares, a fim de estabelecer as características operacionais dos métodos padronizados e nas quatro amostras das gestantes reagentes na QMIA).

5.2.1 Imunoensaio de micropartículas por quimioluminescência (QMIA)

O ensaio de QMIA para o HTLV1/2, para detecção qualitativa de anticorpos contra o HTLV-1/2 em amostras de soro e plasma, foi realizado utilizando-se o kit HTLV1/2, (ABBOTT, EUA) no equipamento Architect. É um imunoensaio de dois passos para a detecção qualitativa de anticorpos contra o HTLV-1/2 que consiste em uma combinação da amostra e do diluente de ensaio. Uma alíquota da amostra pré-tratada e as micropartículas paramagnéticas revestidas de HTLV-1/2 são combinadas em uma nova célula de reação. Os anticorpos anti-HTLV presentes na amostra ligam-se às micropartículas revestidas de peptídeo sintético de HTLV-1/2 e antígeno recombinante do HTLV-1. Após a lavagem, os conjugados marcados com acridínio ligam-se aos anticorpos anti-HTLV-1/2. Após o ciclo de lavagem, a solução pré-ativadora é adicionada à mistura de reação. A reação quimioluminescente resultante é medida em unidades de luz relativa (ULR).

5.2.2 Teste complementar confirmatório - *Western Blot*

O ensaio de WB foi realizado com o kit INNO-LIA (INNOGENETICS, Bélgica), que emprega antígenos recombinantes e os peptídeos sintéticos derivados

de sequências que identificam HTLV-1 e também HTLV-2. Em adição a estes antígenos de HTLV, linhas de controle são utilizadas para a avaliação dos resultados, bem como para a adição da amostra e dos controles de reagentes. O teste foi realizado em amostras que apresentaram resultados reagentes no teste de triagem QMIA, de acordo com as recomendações do fabricante: em cada canaleta, previamente identificada como controle positivo, negativo ou amostra, foi adicionado 1 mL de diluente de amostra e uma fita contendo as proteínas virais. Em seguida, foram acrescentados 20 µL de amostra ou controles, seguido de uma etapa de três horas de incubação em temperatura ambiente (18-25 °C e ao abrigo da luz). Em seguida, o material foi descartado e incubado por seis minutos com 1 mL de solução de lavagem. Essa etapa foi repetida por duas vezes. A solução de lavagem foi descartada e adicionou-se 1 mL de solução de conjugado, incubando por 30 minutos. Procedeu-se a etapa de lavagem, conforme descrito anteriormente. Adicionou-se 1 mL da solução de substrato e incubou-se por 30 minutos. Em seguida, a solução de substrato foi retirada, adicionou-se 1 mL da solução de parada, incubou-se por 30 minutos. Após essa etapa, a solução foi descartada, e procedeu-se a leitura, de acordo com as orientações do fabricante. A presença de reatividade para as proteínas virais foi indicada pelo desenvolvimento de cor, proporcional à quantidade de anticorpos para o HTLV presentes na amostra.

5.2.3 Teste complementar confirmatório - Método Molecular

Os métodos moleculares foram desenvolvidos de acordo com as seguintes etapas:

5.2.3.1 Obtenção do concentrado de leucócitos (*buffy coat*)

Foram coletados aproximadamente 10 mL de sangue total dos pacientes que apresentaram resultado reagente no teste de QMIA, em tubos contendo EDTA ou

ácido citrato dextrose (ACD). As amostras foram processadas para a obtenção do *buffy coat*. Para tanto, utilizou-se o reagente Histopaque®-1077 (Sigma-Aldrich, USA), composto por uma solução de sacarose e diatrizoato de sódio, com densidade apropriada para a separação dos leucócitos.

Em um tubo tipo falcon de 15 mL adicionou-se cuidadosamente 6 mL de sangue total sobre 3 mL de Histopaque® e centrifugou-se por 30 minutos a 400 g em temperatura ambiente. Durante a centrifugação ocorre a agregação dos eritrócitos e granulócitos, enquanto que os linfócitos e monócitos permanecem na interface plasmática, formada pelo plasma e Histopaque®. O anel de leucócitos foi delicadamente retirado, transferido para um novo tubo falcon, acrescentado tampão salina fosfatada (PBS) pH 7,2, e centrifugado por 10 minutos a 200 g. O sobrenadante foi descartado e ao tubo foi acrescentada nova solução de PBS, repetindo-se a centrifugação. Esta etapa foi repetida 3 vezes. O *pellet* foi reconstituído em 1 mL de PBS e a contagem de leucócitos totais foi obtida no equipamento para análises hematológicas Advia 2120 (Siemens®) e ajustada entre 2 e 5 milhões de células/mL. As células foram armazenadas em microtubo com capacidade para 1,5 mL, livre de RNases e DNases à -20 °C até a realização da extração do DNA proviral e PCR, precedida por quantificação do DNA no equipamento Nanodrop™.

5.2.3.2 Extração do DNA proviral do HTLV a partir do concentrado de leucócitos (*buffy coat*)

Para a extração do DNA proviral do HTLV, a partir do concentrado de leucócitos, foi utilizado o kit comercial de extração *Purelink® Genomic DNA Mini Kit Invitrogen by Life Technologies*, de acordo com as recomendações do fabricante. Transferiu-se 200 µL da amostra e 25 µL de proteinase K para um microtubo contendo 200 µL do tampão de lise, homogeneizando-os e incubando-os a 56 °C por 15 minutos. Após, adicionou-se 210 µL de etanol PA (96% a 100%). A mistura foi transferida para microtubo contendo uma membrana de sílica e centrifugada por um minuto a 11.000 g. A coluna foi transferida para um novo microtubo, adicionou-se 500 µL de tampão de lavagem e centrifugou-se por um minuto a 11.000 g.

Descartou-se o tubo de coleta com o filtrado e a coluna foi novamente transferida para um novo microtubo. Adicionou-se 600 µL de tampão de lavagem, centrifugou-se por um minuto a 11.000 g. Descartou-se somente o filtrado. A coluna foi centrifugada por um minuto a 11.000 g para a remoção do etanol residual. Adicionou-se 200 µL de tampão de eluição previamente aquecido (56 °C) diretamente sobre a membrana de sílica e o material recuperado foi utilizado nas reações moleculares.

5.2.3.3 PCR convencional

Inicialmente, foi necessária a padronização do método de PCR convencional (*nested* PCR). Para tanto, utilizou-se o DNA extraído de 80 amostras pré-selecionadas, conforme apresentado na Figura 6. As determinações foram realizadas em quintuplicatas para estabelecer a reprodutibilidade do método das determinações.

Para o grupo de gestantes foi realizada a PCR nas quatro amostras positivas para o teste de QMIA.

Para a PCR convencional foram utilizados como DNA alvo porções dos genes provirais *tax* e *pol* (Tabela 1). Como controle interno da reação foi utilizado um gene humano constitutivo, β globina (MANOS et al., 1989; COSTA et al., 2011).

TABELA 1 - OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE PCR E SEQUENCIAMENTO E SUAS CARACTERÍSTICAS

Gene Alvo	Nome do oligonucleotídeo	Seqüência 5'– 3'	Posição	Tamanho do produto
<i>Tax</i>	SK 43 <i>forward</i>	CGG ATA CCC AGT CTA CGT GT	7359-7378	159 pb
	SK 44 <i>reverse</i>	GAGCCGATAACGCGTCCATCG	7517-7497	
<i>nested-tax</i>	TAX 1 <i>forward</i>	GTGTTTGCGGATTGTGTACA	7375-7394	128 pb
	TAX 2 <i>reverse</i>	CCATCGATGGGGTCCCA	7502-7486	
<i>Pol</i>	SK 110 <i>forward</i>	CCHTACAAYCCMACCAGCTCAG	4758-4779	186 pb
	SK 111 <i>reverse</i>	GTGGTGRACYTGCCATCGGGTTTT	4943-4920	
<i>nested-pol</i> HTLV-1	POL 1.1	TTGTAGAACGCTCTAATGGCATTTC	4783-4806	136 pb
	POL 3.1	TGGCAGTTGGTTAACACATTTCAGG	4918-4895	
<i>nested-pol</i> HTLV-2	POL 1.2	CCTGGTTCGAGAGAACCAATGGTG		138 pb
	POL 3.2	CCACTGGGGTTCATGACATTTAGC		

FONTE: Modificado de COSTA et al. (2011).

Para um volume final de 50 μ L adicionou-se 5 μ L de DNA, extraído conforme item 5.2.3.2, a uma mistura contendo 4 μ L de dNTPs (2,5 mM), 5 μ L de solução tampão (10X), 1,5 μ L de MgCl (50 nM) 0,2 μ L de enzima *Taq Platinum* DNA polimerase, 1 μ L de cada oligonucleotídeo iniciador: na primeira amplificação do gene *tax* foram utilizados iniciadores SK43 e SK44 e na *nested*-PCR os iniciadores TAX1 e TAX2 que possibilitam a amplificação do HTLV, sem diferenciar entre tipo 1 e tipo 2. Para o gene *pol*, na primeira PCR foram utilizados os oligonucleotídeos SK110 e SK111 e na *nested* PCR, HTLV-1 (POL 1.1 e POL 3.1) e HTLV-2 (POL 1.2 e POL 3.2), conjunto de oligonucleotídeos que discriminam os tipos 1 e 2 do HTLV e 32,3 μ L de água. A sequência e a localização dos oligonucleotídeos utilizados estão apresentadas na Tabela 1. A amplificação foi realizada em termociclador Veriti *Thermal Cycler Applied Biosystems*®, utilizando diferente termociclagem para cada gene. Para o gene *tax*: desnaturação (94 °C – 2 minutos), seguido de 40 ciclos de 94 °C – 30 segundos; 55 °C – 30 segundos; 72 °C – 30 segundos e extensão final de 72 °C – 7 minutos. Para o gene *pol*: fase inicial de desnaturação (94 °C – 2 minutos), seguido de 35 ciclos de 94 °C – 30 segundos; 58 °C – 30 segundos; 72 °C – 2 minutos e extensão final de 72 °C – 7 minutos. Para o gene da β globina: desnaturação inicial (94 °C – 2 minutos), seguido de 35 ciclos de 94 °C – 30 segundos; 58 °C – 30 segundos; 72 °C – 2 minutos e extensão final de 72 °C – 7 minutos. Para a *nested* PCR 2 adicionou-se 5 μ L do produto da PCR 1 seguindo as mesmas condições de termociclagem. Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio (0,5 μ g/mL), por 30 a 40 minutos e 110 V. Os géis foram fotografados sob luz ultravioleta e as bandas foram analisadas utilizando o programa E-capt. Para o gene *tax* evidenciou-se um produto de 128 pb e para o gene *pol* um produto de 136 pb para HTLV 1 e 138 pb para HTLV 2. O gene da β globina foi utilizado como controle da extração e amplificação do material genético (MANOS et al.,1989).

5.2.3.4 Clonagem do produto de PCR da padronização

A clonagem dos produtos de PCR de uma amostra positiva do estudo da

padronização teve por objetivo a obtenção de DNA plasmidial, o qual foi utilizado como controle positivo para a validação dos métodos de PCR convencional. Após purificação dos produtos de PCR, com o kit *Purelink® Genomic DNA Mini Kit Invitrogen, Life Technologies*, de acordo com as recomendações do fabricante, os fragmentos foram clonados em vetores de plasmídeos utilizando-se o pGEM (Promega, EUA). O plasmídeo recombinante foi utilizado para transformar bactérias *E coli* quimicamente competentes, seguido de plaqueamento em meio apropriado para o crescimento bacteriano. A presença de clones contendo o inserto foi triada pela alteração da coloração das colônias presentes nas placas e confirmada por PCR. Posteriormente, estes plasmídeos foram purificados e encaminhados para o sequenciamento nucleotídico, com o objetivo de confirmar a presença do inserto, conferida por meio de PCR.

5.2.3.5 Sequenciamento nucleotídico

O sequenciamento viral foi utilizado para a caracterização genotípica dos vírus detectados e confirmação dos plasmídeos contendo produtos purificados de PCR da amplificação dos genes *tax* e *pol*. Utilizou-se para cada amostra 1 µL do *Big Dye Terminator V3.1 Cycle sequencing Kit* (Applied Biosystems Inc., CA), 1,5 µL de tampão cinco vezes concentrado, água ultrapura q.s.p. 10 µL, 0,5 µL dos iniciadores direto ou reverso na concentração de 5 pmol e 6 µL do produto de PCR purificado. A reação de sequenciamento foi realizada em termociclador Veriti® Thermal Cycler Applied Biosystems®, nas seguintes condições de termociclagem: desnaturação inicial: a 96 °C por um minuto, 35 ciclos de desnaturação 96 °C por 15 segundos, hibridização 55 °C por 30 segundos e extensão 60°C por 4 segundos com manutenção do produto final em 4°C.

Na sequência foi realizada a etapa de purificação e precipitação do material marcado amplificado, adicionou-se a cada poço da placa 66 µL de etanol absoluto, 2 µL de acetato de amônio 7,5 mol/L e 10 µL de água ultra pura. A placa foi mantida em repouso, no gelo, protegida da luz. Em seguida foi realizada a centrifugação a 2.200 g por 45 minutos (Eppendorf Centrifuge 5430R).

O sobrenadante foi descartado por inversão da placa e adicionou-se a cada

poço 100 µL de etanol 70%. Foi realizada nova centrifugação a 2.200 g por 20 minutos e o sobrenadante foi descartado novamente. A placa foi mantida por até 12 horas em temperatura ambiente para secagem, ao abrigo da luz. Após, a placa foi vedada e armazenada a – 20 °C até a realização do sequenciamento.

Para sequenciamento, as amostras foram solubilizadas adicionando-se 10µL de formamida Hi-Di™(Applied Biosystems, Inc., EUA) a cada poço, aquecimento a 96 °C por 5 minutos e manutenção em gelo até a colocação da placa no sequenciador automático modelo 3.500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems Inc., EUA), do departamento de bioquímica da Universidade Federal do Paraná ou na Plataforma ABI Prism 3130 xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems Inc., EUA) do laboratório Central do Estado do Paraná (LACEN-PR).

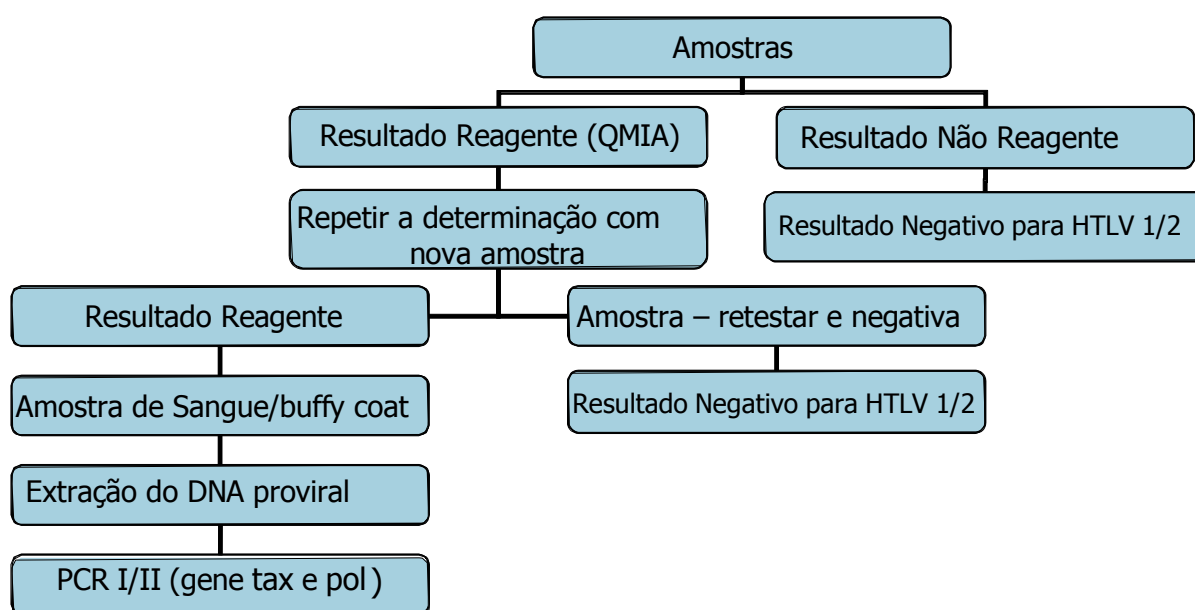
Para as análises de sequenciamento nucleotídico, as sequências foram editadas por meio do editor *BioEdit Sequence Alignment Editor Copyright®*, versão 7.0.5.3, 1997-2005 (HALL, 1999). Após a edição das sequências, essas foram comparadas com sequências do banco de genes por meio do programa *Basic Local Alignment Search Tool* (disponível em <http://www.ncbi.nih.gov/BLAST>), do *National Center Biotechnology Informations* (NCBI). As similaridades encontradas definiram a presença do gene do vírus nas amostras positivas. Inferiu-se relações filogenéticas por meio do programa Mega 7.0, as árvores filogenéticas foram construídas utilizando-se os programas *Neighbor-Joining* e Verossimilhança (KUMAR;STECHEER;TAMURA, 2016).

5.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA DA PADRONIZAÇÃO

Os dados foram inseridos em planilha eletrônica Excel da Microsoft, sendo analisados e descritos por mediana e intervalo interquartil. Para o cálculo das características operacionais dos métodos de biologia molecular, utilizou-se porcentagens de concordância e discordância, sensibilidade ($VP/VP + FN \times 100$), especificidade ($VN/VN + FP \times 100$), valor preditivo positivo ($VP/VP + FP \times 100$), valor preditivo negativo ($VN/VN + FN \times 100$), taxa de falso positivo ($100 - VPP$), valor presuntivo positivo ($VP+FP/\text{total de amostras}$), razão de detecção ($VP/\text{total de}$

amostras), índice de Youden [(sensibilidade + especificidade) – 1], razão de erro (FP+FN/ total de amostras), erro combinado (FP+FN/total de amostras), razão de verossimilhança positiva (sensibilidade/1– especificidade), razão de verossimilhança negativa (1–sensibilidade/especificidade).

FIGURA 7 - FLUXOGRAMA DE TESTAGEM DAS AMOSTRAS DO ESTUDO (GESTANTES)



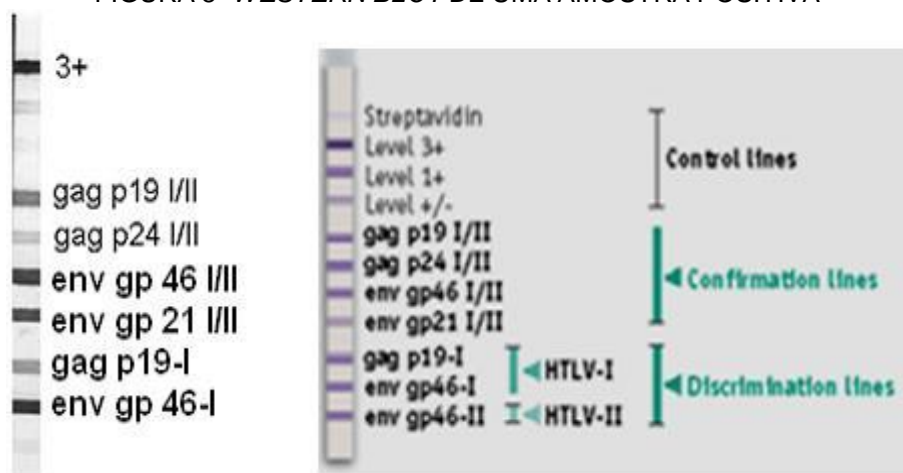
FONTE: O autor (2016).

6 RESULTADOS

6.1 PADRONIZAÇÃO DA METODOLOGIA MOLECULAR

Todas as amostras, descritas no item 5.1.1, foram submetidas à análise de anticorpos por meio do método de QMIA. Em um total de 80 amostras, 20 apresentaram resultados reagentes. Destas, 20 foram submetidas ao método de WB, sendo todas confirmadas.

FIGURA 8- WESTERN BLOT DE UMA AMOSTRA POSITIVA



FONTE: O autor (2016).

6.1.1 Métodos moleculares

6.1.1.1 Obtenção do *buffy coat*

A contagem de células foi realizada em equipamento de hematologia automatizado, após a obtenção do *buffy coat* e foi observado que houve uma boa recuperação de células, de acordo com o protocolo utilizado Histopaque®-1077 (Sigma-Aldrich USA).

6.1.1.2 Extração do DNA proviral

O DNA foi extraído por método comercial já descrito. Após a extração, as concentrações e a pureza do material extraído foram analisadas por meio do Nanodrop (ThermoScientific®). As concentrações variaram de 8,5 a 71 ng/μL, com uma média de 26,4 ng/μL, sendo que as purezas foram satisfatórias e variaram de 1,8 a 2,0 (260/280nm).

6.1.1.3 PCR para β globina

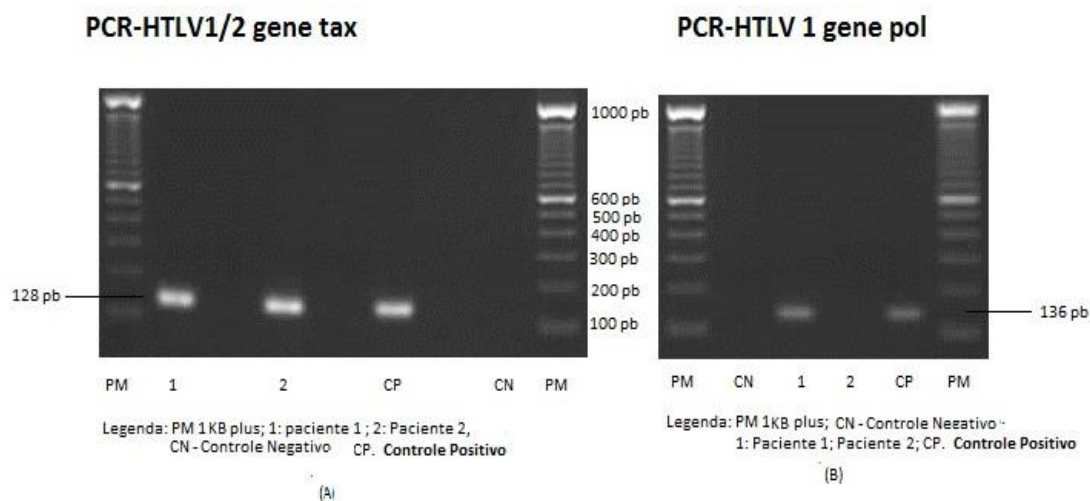
Foi realizada a PCR utilizando-se oligonucleotídeos específicos para amplificação do gene da β globina humano, de acordo com o protocolo descrito por Manos e colaboradores (1989). Este foi utilizado para monitorar e comprovar a extração do material genético. Todas as amostras apresentaram sinais compatíveis com os tamanhos esperados.

6.1.1.4 PCR para gene *pol* e *tax* do HTLV

Todas as amostras selecionadas para o teste de padronização, foram submetidas à amplificação dos genes específicos *pol* e *tax*, seguindo o protocolo descrito por Costa e colaboradores (2011).

Utilizou-se controles negativo (água ultra pura) e positivo (amostra de paciente com diagnóstico de PET, clonada) em todas as reações de amplificação, para o monitoramento da PCR. Foram utilizados os genes alvo *tax* e *pol* com os oligonucleotídeos apresentados na Tabela 1, que neste caso foram o TAX1 (*forward*) e TAX 2 (*reverse*) com um produto esperado de 128pb e gene *pol* com os oligonucleotídeos POL1.1 (*forward*) e POL3.1 (*reverse*) com um produto esperado da PCR de 136pb como pode-se observar na Figura 9.

FIGURA 9 - SINAIS OBTIDOS NA PCR DO GENE *pol* e *tax* DO HTLV:
GEL CORADO COM BROMETO DE ETIDIO



FONTE: O autor (2016).

6.1.2 Sequenciamento do material clonado

Selecionou-se a amostra do paciente com diagnóstico de MAH/PET e com resultado reagente na QMIA e WB, e, a partir desta, realizou-se PCR para os genes *tax* e *pol*, sendo os resultados detectados em gel de agarose (Figura 9). A amostra foi selecionada para o desenvolvimento do método de clonagem gênica e produção de controle positivo para padronização do método de PCR convencional (*nested*). Do material obtido, foi realizado o sequenciamento nucleotídico do produto de PCR do gene *pol* obtido a partir do inserto em plasmídeo pGEM®-T Easy Vector Systems. As sequências nucleotídicas foram primeiramente analisadas e editadas, utilizando o programa *BioEdit Version 7.0*. Após análise dessas sequências, identificou-se por alinhamento na ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) – similaridade de 98% com sequências HTLV 1, depositadas na base de dados do GenBank (Figura 10).

FIGURA 10 – MATRIZ DE IDENTIDADE DA SEQUENCIA DA AMOSTRA SELECIONADA COMO CONTROLE POSITIVO E SEQUÊNCIAS DE HTLV (GENE *pol*) DISPONÍVEIS NO GENBANK



FONTE: O autor (2016)

NOTA: Linha 1: HTLV HC - Sequência de oligonucleotídeos obtida a partir de sequenciamento nucleotídico; Linhas 2 a 60 - Alinhamento obtido por meio da ferramenta BLAST (NCBI), com amostras referência, disponíveis no Genbank, como similaridade superior a 96%.

Na Tabela 2, podem ser observados os cálculos das características operacionais dos testes de PCR em relação ao critério de testagem sorológica do HTLV.

TABELA 2 - ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS OPERACIONAIS DA METODOLOGIA DE PCR CONVENCIONAL

Critério MS Portaria	Critério MS+	Critério MS -	Total
PCR +	13	0	13
PCR -	07	60	67
Total	20	60	80

FONTE: O autor (2016).

NOTA: Sensibilidade: 65% (IC 95% 46-88%); Especificidade: 100% (IC 95% 94-100%); Valor Preditivo Negativo: 83% (IC 95% 81-96%); Valor Preditivo Positivo: 100% (IC 95% 77-100%); Prevalência da doença 25% (IC 95% 10-28%); Índice de Youden = 0,7.

Critério MS+: Amostras com resultados reagentes para QMIA e *Western Blot*;
Critério MS-: Amostras não reagentes pelo método de QMIA.

LEGENDA: IC - intervalo de confiança; MS - Ministério da Saúde.

Foi observada concordância de 100% entre os resultados obtidos pelas diferentes metodologias (QMIA, WB, PCR), para os pacientes diagnosticados com PET. Para os portadores assintomáticos, os métodos de diagnóstico sorológicos apresentaram uma concordância dos resultados de 100% e os métodos de PCR foram concordantes em 54% dos casos quando se considera a pesquisa dos genes *pol* e *tax* (Tabela 3). Para as amostras de doadores de sangue com sorologia negativa para HTLV, foi encontrada uma concordância entre os métodos de QMIA e PCR de 100%. Para um dos pacientes com diagnóstico de AIDS (grupo controle composto por indivíduos com infecção por Retrovírus), os testes sorológicos QMIA e WB foram reagentes, no entanto, a PCR resultou em não detectada, sendo a concordância de 97%. Já o paciente com diagnóstico de Esclerose Múltipla apresentou resultados sorológicos e moleculares negativos para o HTLV. Nesse grupo, a concordância entre os métodos foi de 100% (Tabela 3).

TABELA 3 - CONCORDÂNCIAS DOS RESULTADOS OBTIDOS PELOS DIFERENTES MÉTODOS PARA OS GRUPOS DA PADRONIZAÇÃO

	Pacientes PET n=06	Portadores Assintomáticos n=13	Doadores de sangue n=30	Pacientes AIDS n=30	Esclerose Múltipla n=01
QMIA	R (6/100%)	R (13/100%)	NR (30/100%)	NR (30/100%)	NR (1/100%)
WB	R (6/100%)	R (13/100%)	NA	R (1/3%)	NA
PCR TAX/POL	R (6/100%)	R (7/54%)	NR (30/100%)	NR (29/97%)	NR (1/100%)

FONTE: O autor (2016).

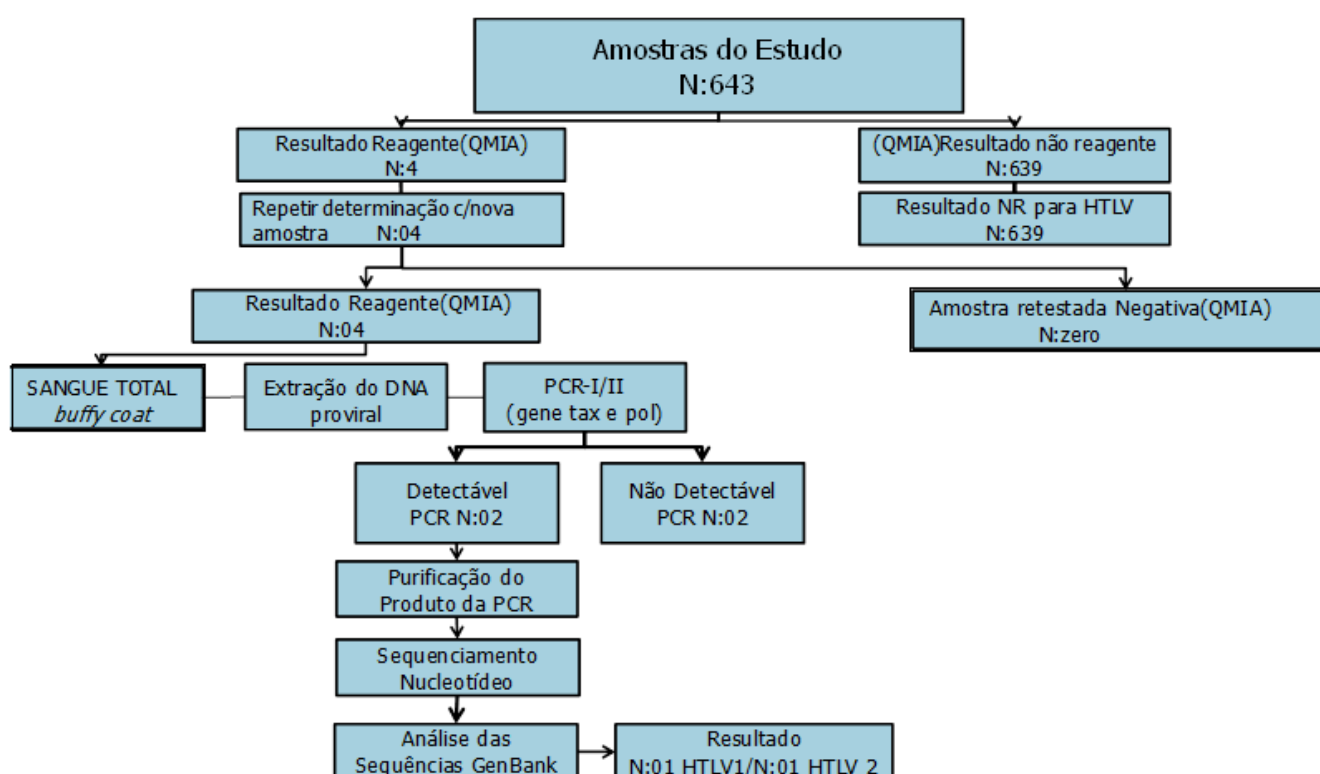
NOTA: Considerou-se como positiva a amostra que apresentou resultado detectado para pelo menos um dos genes (*tax/pol*).

LEGENDA: NA - não analisado; R - reagente, NR - não reagente.

6.2 GESTANTES

As amostras de 643 gestantes de alto risco foram analisadas com base no resultado de HTLV e revisão de prontuários (Figura 11).

FIGURA 11 – FLUXOGRAMA UTILIZADO NA ANÁLISE DAS AMOSTRAS DAS GESTANTES



FONTE: O autor (2016).

6.2.1 Prevalência de HTLV-1/2 nas gestantes com resultados reagentes para HTLV

Do total de amostras analisadas (643) por meio do método de QMIA para detecção de anticorpos para HTLV, 4 pacientes (0,63%) apresentaram resultado reagente, conforme demonstrado na Tabela 4. Destas, duas (0,31%) apresentaram

sinais detectados compatíveis com os tamanhos dos produtos de PCR demonstrados na Figura 12.

TABELA 4 - RESULTADOS SOROLÓGICOS PARA HTLV DAS QUATRO PACIENTES

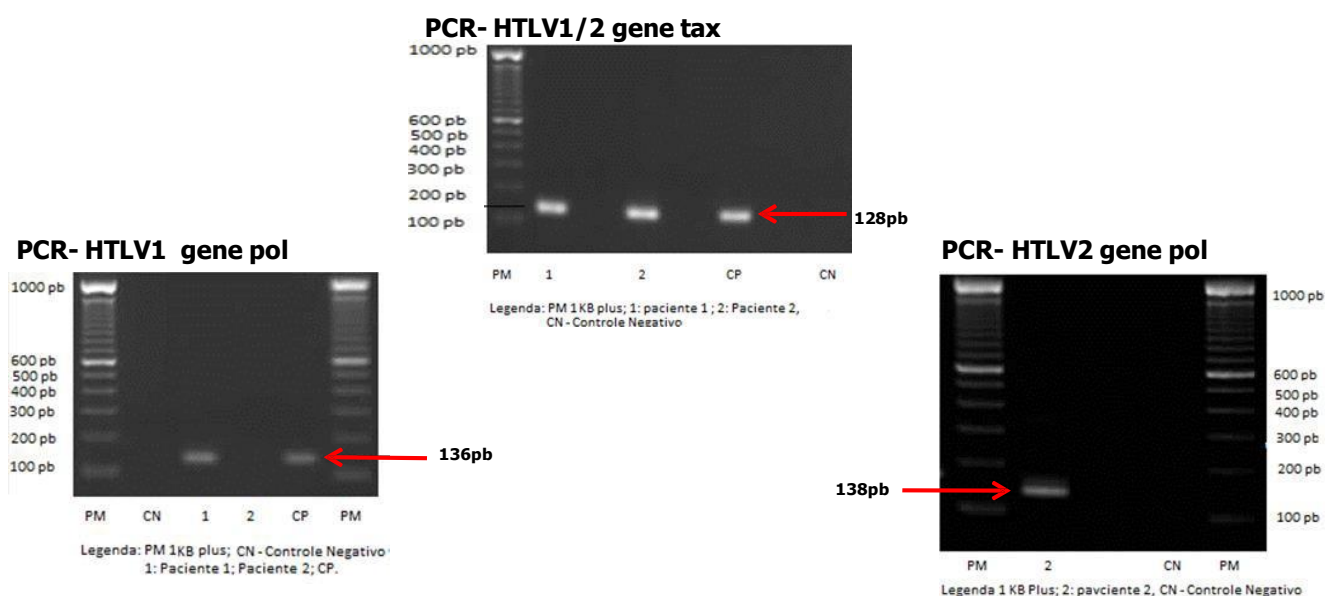
Exames	Paciente 01	Paciente 02	Paciente 03	Paciente 04
HTLV-QMIA (S/CO URL)	R (1,3)	R (2,5)	R (137,5)	R (78,27)
HTLV PCR	ND	ND	Detectado	Detectado

FONTE: O autor (2016).

NOTA: S/CO < 1 são consideradas não reativas; S/CO ≥ 1 são consideradas reativas.

LEGENDA: R - Reagente; ND - Não Detectado; S – *sample* (amostra); CO – *cut off* (valor de corte); URL – Sinal de quimioluminescência emitido pelo equipamento.

FIGURA 12 - SINAIS OBTIDOS NA *nested* PCR DO GENE *pol* e *tax* DO HTLV DAS DUAS AMOSTRAS POSITIVAS



FONTE: O autor (2016).

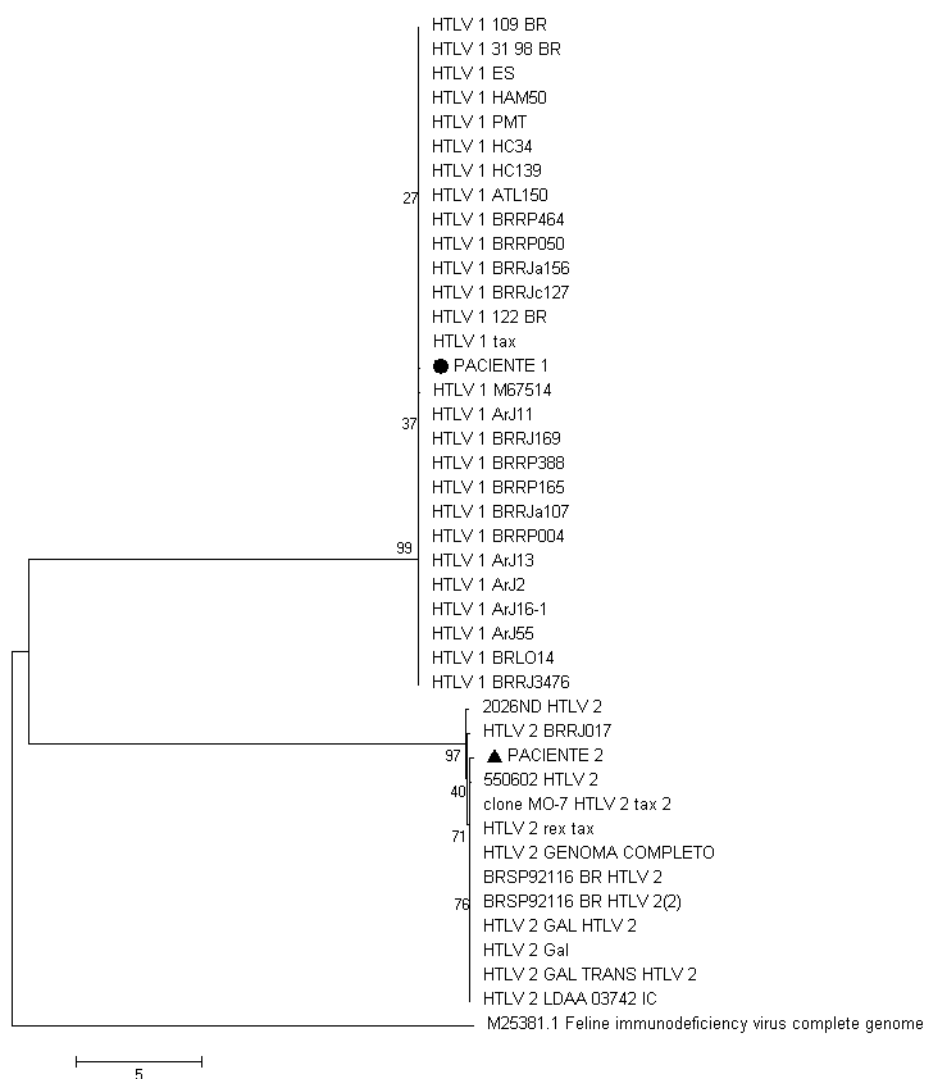
NOTA: Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio.

6.2.1.1 Sequenciamento das amostras positivas das gestantes

Com base na análise molecular do gene *tax* as sequências foram classificadas em dois grupos distintos. As sequências consenso geradas a partir do sequenciamento foram alinhadas por meio da ferramenta *Clustal* conforme implementado no programa MEGA versão 7.0 (KUMAR; STECHER; TAMURA,

2016) com sequências para o HTLV extraídas do banco de dados *GenBank* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). A avaliação filogenética foi realizada pelo método de Máxima Verossimilhança utilizando o modelo de substituição nucleotídica de 500 pseudoréplicas (*bootstrap*). Observa-se na Figura 13 que as duas amostras se agrupam em clados diferentes podendo ser classificadas como HTLV 1 e 2. A paciente 1 do estudo apresentou maior similaridade (98%) na análise feita com a ferramenta BLAST com os isolados do Brasil HTLV-1, sendo estes similares ou pertencentes ao ramo denominado ramo B das amostras da América Latina. A paciente 2 apresentou maior similaridade (98%) no BLAST com os isolados do Brasil HTLV-2.

FIGURA 13 - AVALIAÇÃO FILOGENÉTICA BASEADA NO ALINHAMENTO DAS SEQUENCIAS NUCLEOTÍDICAS DE REGIÃO DO GENE *tax* PELO MÉTODO DA MÁXIMA VEROSSIMILHANÇA



Fonte: O autor (2016)

NOTA: A história evolutiva foi inferida usando o método de Máxima Verossimilhança, utilizando o modelo de substituição nucleotídica com 500 pseudoréplicas (*bootstrap*). Sequência de região do gene *tax* dos pacientes 1 e 2 foram alinhadas com sequências extraídas do banco de dados GeneBank (Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>, em 06/02/2017). As avaliações evolutivas foram realizadas no programa MEGA 7.0 (TAMURA et al., 2013).

LEGENDA: • HTLV-1; ▲ HTLV-2

— : escala da distância entre os ramos.

6.2.2 Perfil demográfico e epidemiológico das pacientes

Analizou-se um total de 643 pacientes, por meio de questionário e prontuários. As gestantes apresentaram a idade mínima de 14 anos e máxima de 47 anos, sendo que as porcentagens se mantiveram na mesma proporção na faixa de 20 a 34 anos e uma proporção de aproximadamente 26% na faixa etária de 35 a 47 anos. Em relação à etnia, prevaleceu a raça branca (84,14%), e o maior percentual de escolaridade encontrado foi o ensino médio completo (28,47%) (Tabela 5).

TABELA 5 - DADOS DEMOGRÁFICOS DAS 643 PACIENTES INCLUIDAS NO ESTUDO RELATIVOS À IDADE, RAÇA E ESCOLARIDADE

Variáveis	Dados	N (%)
Idade (anos)	14 - 19	56 (8,71)
	20 - 24	137 (21,31)
	25 - 29	147 (22,86)
	30 - 34	136 (21,15)
	35 - 47	167 (25,97)
Raça	Branca	541 (84,14)
	Parda	82 (12,75)
	Negra	17 (2,64)
	Amarela	2 (0,31)
	Indígena	1 (0,15)
Escolaridade	EFI	72 (11,20)
	EFC	66 (10,26)
	EMI	91 (14,15)
	EMC	183 (28,46)
	ESI	17 (2,64)
	ESC	35 (5,44)
	SI	179 (27,84)

FONTE: O autor (2016).

LEGENDA: SI - Sem informação; EFI - Ensino Fundamental Incompleto; EFC – Ensino Fundamental Completo; EMI - Ensino Médio Incompleto; EMC - Ensino Médio Completo, ESI - Ensino Superior Incompleto; ESC - Ensino Superior Completo.

Em relação aos dados epidemiológicos, foram analisados uso de drogas (9,33%), *piercing* (29,70%) e tatuagem (27,53%) (Tabela 6). Do total das pacientes, 271 (42,15%) iniciaram a atividade sexual entre 12 a 16 anos. Em relação ao número de parceiros, a média foi 4, sendo que 311 (48,37%) tiveram de 1 a 5 parceiros, e, em relação à transfusão, 35 (5,44%) receberam transfusão sanguínea.

TABELA 6 - DADOS EPIDEMIOLÓGICOS DAS 643 PACIENTES

Especificação	Dados	n (%)
Uso de drogas	Sim	60 (9,33)
	Não	425 (66,10)
	SI	158 (24,57)
Piercing	Sim	191 (29,70)
	Não	257 (39,97)
	SI	195 (30,33)
Tatuagem	Sim	177 (27,53)
	Não	271 (42,15)
	SI	195 (30,33)
Início Atividade Sexual	12-16	271 (42,15)
	17-24	170 (26,44)
	25-35	8 (1,24)
	SI	194 (30,17)
Número total parceiros	1 a 5	311 (48,37)
	6 a 10	36 (5,60)
	>10	4 (0,62)
	SI	292 (45,41)
Transfusão Sanguínea	Sim	35 (5,44)
	Não	300 (46,66)
	SI	308 (47,90)

FONTE: O autor (2016).

LEGENDA: SI - Sem informação.

Além do HTLV, foram analisados os dados sorológicos dos exames de rotina no perfil do pré-natal. Os resultados encontrados no grupo de 643 gestantes foram: HBsAg: 7 (1,09%) reagentes e 549 (85,38%) não reagentes; Anti-HBs: 110 (17,11%) reagentes e 118 (18,35%) não reagentes; Anti-HBc 4 (0,62%) reagentes e 19 (2,95%) não reagentes; Anti-HBe: 7 (1,09%) reagentes e 1 (0,16%) não reagente; HBeAg: 8 (1,24%) reagentes; Anti-HCV: 4 reagentes (0,62%) e 530 (82,43%) não reagentes; HIV-1/2: 41 (6,38%) reagentes e 548 (85,22%) não reagentes; Toxoplasmose IgG: 236 (36,70%) reagentes e 312 (48,52%) não reagentes; Toxoplasmose IgM: 8 (1,24%) reagentes e 544 (84,60%) não reagentes e sífilis: 25

(3,89%) reagentes e 580 (90,20%) não reagentes (Tabela 7).

TABELA 7 - PERFIL SOROLÓGICO DAS 643 PACIENTES

(continua)

Exames	Resultado	n (%)
HTLV- (QMIA)	R	4 (0,62)
	NR	639 (99,38)
HTLV-PCR*	R	2 (0,31)
	NR	2 (0,31)
HBsAg	R	7 (1,09)
	NR	549 (85,38)
	SI	87 (13,53)
Anti-HBs	R	110 (17,11)
	NR	118 (18,35)
	SI	415 (64,54)
Anti-HBc	R	4 (0,62)
	NR	19 (2,95)
	SI	620 (96,42)
Anti-Hbe	R	7 (1,09)
	NR	1 (0,16)
	SI	635 (98,75)
HBeAg	R	8 (1,24)
	NR	0
	SI	635 (98,75)
Anti-HCV	R	4 (0,62)
	NR	530 (82,43)
	SI	109 (16,95)
Toxoplasmose IgG	R	236 (36,70)
	NR	312 (48,52)
	SI	90 (14,00)
Toxoplasmose IgM	I	5 (0,78)
	R	8 (1,24)
	NR	544 (84,60)
HIV I/II	SI	91 (14,15)
	R	41 (6,38)
	NR	548 (85,22)
Sífilis	SI	54 (8,40)
	R	25 (3,89)
	NR	580 (90,20)
Citomegalovírus IgG	SI	38(5,91)
	R	6 (0,93)
	NR	2 (0,31)
Citomegalovírus IgM	SI	635 (98,76)
	R	0
	NR	8 (1,24)
	SI	635 (98,76)

TABELA 7 - PERFIL SOROLÓGICO DAS 643 PACIENTES
(conclusão)

Rubéola IgG	R	6 (0,93)
	NR	0
	SI	637 (99,07)
Rubéola IgM	R	1 (0,15)
	NR	4 (0,62)
	SI	638 (99,22)
RESUMO DOS ACHADOS		
IST		12%
HIV		6,38%
Sífilis		3,89%
Hepatite B		1,09 %
Hepatite C		0,62%
Toxoplasmose IgG		48,52%
Toxoplasmose IgM		1,24%

FONTE: O autor (2016).

NOTA: * O HTLV-PCR foi utilizado como método confirmatório para as 4 amostras que foram reagentes no método de HTLV – QMIA.

LEGENDA: R - Reagente; NR - Não Reagente; SI - Sem Informação; I - Indeterminado; HBsAg - Antígeno de superfície do vírus da hepatite B; Anti-HBS - Anticorpo dirigido ao antígeno de superfície do vírus da hepatite B; Anti-HBc - Anticorpo dirigido ao antígeno do core do vírus da hepatite B; HBeAg - Antígeno “e” do vírus da hepatite B; Anti-HCV - Anticorpo dirigido ao vírus da hepatite C; IST – Infecções sexualmente transmissíveis.

Em relação ao histórico obstétrico das 643 gestantes, 268 (41,68%) tiveram de 2 a 3 gestações e 298 (46,34%) esperavam o primeiro filho (Tabela 8).

TABELA 8 - HISTÓRICO OBSTÉTRICO DAS 643 PACIENTES
(continua)

Histórico Obstétrico		n	%
Número de gestações	1	136	21,15
	2 – 3	268	41,68
	≥ 4	141	21,93
	SI	98	15,24
Parto Normal	Zero	298	46,34
	1	131	20,37
	2 - 3	96	14,93
	≥ 4	18	2,80
	SI	100	15,55
Cesárea	Zero	345	53,65
	1	121	18,82
	2-3	72	11,20
	≥4	4	0,62
	SI	101	15,71

TABELA 8 - HISTÓRICO OBSTÉTRICO DAS 643 PACIENTES

		(conclusão)	
Aborto	Zero	385	59,87
	1	105	16,33
	2-3	48	7,46
	≥4	5	0,78
	SI	100	15,55

FONTE: O autor (2016).

LEGENDA: SI - Sem informação.

Por fim, na Tabela 9 estão compilados os dados demográficos, epidemiológicos, histórico obstétrico e dados sorológicos específicos das quatro pacientes que apresentaram resultado positivo para HTLV por meio dos métodos de QMIA e PCR.

TABELA 9 - DADOS DEMOGRÁFICOS, EPIDEMIOLÓGICOS, HISTÓRICO OBSTÉTRICO E LEVANTAMENTO SOROLÓGICO DAS QUATRO PACIENTES HTLV POSITIVAS PELO MÉTODO DE QMIA e PCR

Dados	Variáveis	Paciente 01	Paciente 02	Paciente 03	Paciente 04
Sorologia	QMIA	R	R	R	R
PCR	Genes <i>pol/tax</i>	ND	ND	D	D
Demográficos	Idade (anos)	32	19	37	23
	Raça	Parda	Branca	Parda	
		Branca	Escolaridade		EFI
Epidemiológicos		EFC	EFC	EMI	Uso de
	Drogas	Não	Não	Não	Não
	<i>Piercing</i>	Não	Sim	Não	Não
	Tatuagem	Não	Sim	Não	Sim
	I.A.S (anos)	13	12	13	15
	Nº total de parceiros	1	3	4	8
Histórico Obstétrico	Transfusão				
	Sanguínea	Não	Não	Não	Não
	Nº de gestações	3	2	6	4
	Parto normal	1	1	5	2
Sorológicos	Aborto	1	0	0	1
	HBsAg	NR	NR	SI	NR
	Anti-HBS	R	SI	SI	SI
	Anti-HBc	SI	SI	SI	SI
	HBeAg	SI	SI	SI	SI
	Anti-HCV	NR	NR	SI	SI
	Toxoplasmose IgG	R	R	R	NR
	Toxoplasmose IgM	NR	NR	NR	NR
	HIV I/II	SI	NR	R	NR
	Sífilis	NR	NR	NR	NR
	Citomegalovírus IgG	SI	SI	SI	SI
	Citomegalovírus IgM	SI	SI	SI	SI
	Rubéola IgG	SI	SI	SI	SI
	Rubéola IgM	SI	SI	SI	SI

FONTE: O autor (2016).

LEGENDA: EFI - Ensino Fundamental Incompleto; EFC - Ensino Fundamental Completo; EMI - Ensino Médio Incompleto; I.A.S - Início da atividade sexual; R - Reagente; NR - Não Reagente; SI - Sem informação; D - Detectado; ND - Não Detectado; HBsAg - Antígeno de superfície do vírus da Hepatite B; Anti-HBs - Anticorpo dirigido ao antígeno de superfície do vírus da hepatite B; Anti-HBc – Anticorpo dirigido ao antígeno do *core* do vírus da hepatite B; HBeAg - Antígeno “e” do vírus da hepatite B; Anti- HCV - Anticorpo dirigido ao vírus da hepatite C.

7 DISCUSSÃO

O acompanhamento de gestantes no pré-natal é essencial para garantir a saúde materna e fetal. A realização de exames laboratoriais nesse período é fundamental para o monitoramento e possível detecção de doenças infecto-contagiosas de transmissão vertical, denominadas infecções congênicas e perinatais (REICHE et al., 2000; BRASIL, 2006; FIGUEIRÓ-FILHO et al., 2007). Essa medida tem por objetivo estabelecer tratamento precoce de doenças prevenindo a transmissão vertical, bem como o aconselhamento no período gestacional. O Ministério da Saúde recomenda a realização da investigação de anticorpos anti HTLV em gestantes em áreas geográficas específicas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013). No entanto, os levantamentos epidemiológicos relativos à prevalência do HTLV são escassos na população em estudo, pois a notificação não é compulsória e a triagem não faz parte da rotina do pré-natal.

Neste estudo foram incluídas 643 gestantes, as quais realizaram os exames de QMIA para o HTLV-1/2. Do total de amostras, quatro (0,62%) apresentaram resultados reagentes, sendo que duas (0,31%) foram confirmadas por PCR.

A sensibilidade do método de QMIA varia de 97,3% a 100%, sendo que a alta sensibilidade é a capacidade de um teste determinar indivíduos que são portadores da doença para que não tenham resultados falso negativos na triagem. Porém, os resultados sorológicos para detecção dessa infecção não têm demonstrado resultado satisfatório, pois em uma infecção recente, quando a resposta imune ainda está se desenvolvendo, nem sempre esses anticorpos específicos estão presentes em quantidades detectáveis (SANTOS; LIMA, 2005; LOPES, 2006; LOPES; PROIETTI, 2008; BRASIL, 2013). Os ensaios de triagem detectam anticorpos contra o HTLV-1/2, porém, ao serem usados em população de baixa frequência, o valor preditivo positivo pode ser baixo, sendo necessária a confirmação do resultado por meio dos ensaios complementares, que detêm maior especificidade e que podem também discriminar os anticorpos específicos contra o HTLV-1 ou HTLV-2. Há também os casos de falso positivo quando os valores estão próximos do resultado *cut off* na faixa de 10 a 20% de desvio padrão (SABINO; DE CARVALHO, 2015).

Os resultados dos valores da QMIA em unidades S/CO para um *cut off* de 1,0 em duas pacientes foi de 1,3 e 2,5 S/CO, respectivamente, sendo estas não detectadas no método complementar (PCR). As outras duas amostras que tiveram resultados na QMIA com valores de 78,27 e 137,5 S/CO, tiveram confirmada a detecção do HTLV pelo método de PCR. Estes dados confirmam a necessidade da utilização do teste complementar, como preconiza o Ministério da Saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1998). No presente estudo, foi realizada a padronização do método molecular por PCR para ser utilizado como teste complementar com a finalidade de realizar a confirmação do HTLV-1/2 reagente no teste de triagem pelo método de QMIA. O método molecular tem a finalidade de, mesmo com baixas cargas virais, detectar o material genético do HTLV, além de discriminar entre o tipo 1 e 2.

Quanto aos dados demográficos e soroepidemiológicos deste estudo, as duas gestantes HTLV positivas foram analisadas, visando a identificação das possíveis vias de transmissão do vírus. A gestante HTLV-1 positiva com idade de 37 anos e de raça parda, apresentou coinfeção com HIV. A associação de HIV e HTLV foi demonstrada também em estudo de Costa e colaboradores (2011), o qual relata a provável via de transmissão sexual do HTLV, uma vez que ambos os vírus compartilham a mesma via de transmissão. A outra gestante de 23 anos, sem identificação de fator de risco, sugere possível via de transmissão vertical, necessitando investigação familiar para confirmar esta hipótese. As duas gestantes iniciaram a vida sexual aos 13 a 15 anos e relataram um número de parceiros na média de seis.

Com relação aos riscos de exposição à transmissão do HTLV, alguns achados do grupo de 643 gestantes foram comparados com outros estudos, como: (1) início da atividade sexual: onde 42,15% relatou ter iniciado a atividade sexual dos 12 a 16 anos. Em estudo de Souza e colaboradores (2012), 54,21% das pacientes iniciou a sua atividade sexual dos 15 aos 18 anos; (2) uso de drogas: no presente estudo, 9,33% das gestantes relataram ter usado algum tipo de droga, ao passo que em outros estudos com populações semelhantes, os dados encontrados variaram de 1,2% (SOUZA et al., 2012) a 1,5% (MOXOTO et al., 2007), evidenciando que o grupo estudado apresenta maior risco de infecção; (3) uso de preservativos: no presente estudo 80,23% das gestantes relatou usar preservativos às vezes ou quase

nunca em suas relações sexuais, sendo encontrados dados semelhantes por outros autores 79,9% a 83,0% (SOUZA et al., 2012; MOXOTO et. al, 2007). Foram analisados os resultados sorológicos destas gestantes e observou-se que 10,27% (66/643) das gestantes apresentaram sorologia reagente para HIV ou sífilis. Dados inferiores (6,5%) foram observados em Vitória (ES) em pacientes com as mesmas características (LIMA; VIANA, 2009). De acordo com as comparações com dados da literatura, pode-se sugerir que o grupo estudado apresenta um perfil epidemiológico compatível com risco de exposição à transmissão do HTLV.

Nos locais onde a infecção pelo HTLV-1/2 atinge níveis mais elevados, observa-se que a prevalência da infecção é fortemente associada à idade, sendo maior nos indivíduos mais velhos. Da mesma forma, indicadores de pior condição sócio-econômica, como, por exemplo, a educação formal, também foi associada a maiores taxas de infecção em áreas endêmicas e não endêmicas (KAJIYAMA et al., 1986a; CATALAN-SOARES; PROIETTI; CARNEIRO-PROIETTI, 2001).

O resultado encontrado para o HTLV neste estudo foi de 0,31% (2/643), sendo este valor superior ao relatado nas regiões centro-oeste (Mato Grosso do Sul e Goiás), sudeste (São Paulo) e nordeste (Ceará), que foi de aproximadamente 0,1% (BROUTET et al., 1996; OLBRICH NETO; MEIRA, 2004; OLIVEIRA; AVELINO, 2006; FIGUEIRÓ-FILHO et al., 2007; DALL FABRO et al., 2008). Valores superiores ao encontrado neste estudo foram relatados nas regiões sudeste (Belo Horizonte) e nordeste (Bahia), que tiveram prevalência de 1,1 e 1,05%, respectivamente (ANDRADE et al., 1996; MELLO et al., 2014). Todos esses trabalhos utilizaram testes complementares para confirmação dos achados sorológicos.

Em estudo realizado em um grupo de doadores de sangue em dois bancos de sangue na cidade de Curitiba (PR), encontrou-se uma prevalência de 0,08% para o HTLV (KILPP, 2015). Gessain e Cassar (2012) relataram que, em relação ao HTLV, a prevalência encontrada em doadores de sangue, não reflete a mesma taxa na população em geral, o que foi verificado no presente estudo e reforça a necessidade da inclusão deste exame no pré-natal em hospitais que possuem atendimento de gestantes de alto-risco. Enquanto o banco de sangue tem um viés negativo por excluir grupos de risco, o CHC-UFPR tem um viés positivo por atender pacientes de risco.

O CHC-UFPR é um hospital de atendimento terciário de casos de alta complexidade para gestações de alto risco, em que se incluem as gestantes com doenças infecto-contagiosas, como as portadoras de HIV. No presente estudo, encontrou-se prevalência de 6,38% para anticorpos anti-HIV entre as 643 gestantes, o que deve justificar os resultados em relação à coinfeção pelo HIV de uma das gestantes positivas, pois o HTLV tem a mesma via de transmissão do HIV e outras DST. Esta característica de atendimento poderá impactar na taxa de prevalência encontrada, e não reflete a mesma taxa quando comparado à população em geral.

Segundo boletim epidemiológico de HIV-AIDS do Ministério da Saúde, das notificações de gestantes infectadas pelo HIV, a maioria é da região Sudeste (40,5%), seguida pela região Sul com 30,8%. Em 2014, foram identificadas 7.668 gestantes no Brasil contendo anticorpos anti-HIV, sendo 35,1% na região Sudeste, 28,1% no Sul, 20% no Nordeste, 11,2% no Norte e 5,5% no Centro-Oeste. A faixa etária mais acometida está entre 25 a 29 anos, porém, nos últimos dez anos, observou-se aumento do HIV nas gestantes acima de 40 anos. Quanto à raça, há um predomínio da raça parda, seguida da branca, de acordo com dados de 2014 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016a).

A sífilis, em 2015, no Brasil, apresentou uma taxa de 11,2 casos em gestantes/mil nascidos vivos. A taxa na região sul foi de 15,1 casos em gestantes/mil nascidos vivos. Quanto às taxas das Unidades Federativas, o índice mais elevado foi observado no Mato Grosso do Sul (21,9 casos/mil nascidos vivos). No Paraná, o número de casos de sífilis em gestantes, em 2015, foi de 5,6% e em 2012, 3,7%, segundo o boletim epidemiológico do MS-DST de 2015. No presente estudo, encontrou-se a taxa de 3,89% de gestantes com resultados positivos. Entre as capitais, Curitiba-PR apresenta valores inferiores de sífilis congênita e em gestante, em relação à média nacional que é de 6,3 casos/mil nascidos vivos. Desde 2014 enfrenta-se o desabastecimento mundial de matéria prima para a produção do medicamento para o tratamento dessa doença. Em 2015/2016 o Brasil adquiriu 2,7 milhões de frascos de penicilina benzatina 1.200.000 UI (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016b), tendo essa aquisição possivelmente contribuído para que os índices voltassem a diminuir, conforme observado no presente estudo.

Em relação à toxoplasmose, foi encontrada neste estudo uma frequência de 36,70% de positividade, 48,52% de susceptíveis e 1,24% com IgM positivo para

toxoplasmose (IgM). Em estudo realizado em Londrina e Rolândia no Paraná (2012) foi encontrado soroprevalência de aproximadamente 60% (BITTENCOURT et al., 2012). No Brasil, alguns estudos evidenciaram diferentes prevalências da toxoplasmose em gestantes de diferentes regiões, como 31,0% em Caxias do Sul (RS) e 91,6% no Mato Grosso do Sul (FIGUEIRÓ-FILHO et al., 2005; DETANICO; BASSO, 2006).

Em relação ao cenário epidemiológico das hepatites virais no Brasil, as maiores taxas foram observadas nos anos de 2004 e 2005, sendo que a hepatite B apresentou maiores índices em relação à hepatite C em todo o período de 2002 a 2015. No Brasil, nos anos de 1999 a 2015, 22.088 casos de hepatite B (11,2%) foram detectados em gestantes. Destes, 34,2% concentraram-se no Sul; 26,0% no Sudeste; 15,8% no Norte; 14,4% no Centro-Oeste e 9,5% no Nordeste. Na região sul, no ano de 2015, foi detectada uma taxa de 1,0 a 1,2/1000 nascidos vivos. No presente estudo, encontrou-se 1,09% de pacientes com anticorpos anti HBs. Do total de casos de hepatite C com anti-HCV reagente e presença do HCV-RNA notificados no Sinan, durante o período de 1999 a 2015, 64,2% foram observados no Sudeste, 24,2% no Sul, 5,6% no Nordeste, 3,2% no Centro-Oeste e 2,7% no Norte. No presente estudo, encontrou-se 0,62% de positividade em relação ao marcador anti-HCV (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016c).

A transmissão vertical de doenças infecto-contagiosas como o HTLV-1/2 é uma importante rota que pode ser interrompida, se for realizado o acompanhamento sorológico na fase do pré-natal e poderá nortear o clínico para a adoção de aconselhamento à gestante. Neste contexto, este estudo, que foi realizado em um hospital público de referência para gravidez de alto risco, a qual inclui as gestantes com doenças infecto-contagiosas, que compartilham a mesma rota de transmissão do HTLV, é de grande importância. Fatos que evidenciam a necessidade de uma política pública de rotina de triagem HTLV-1/2 no pré-natal, uma vez que aconselhamento e medidas preventivas são as únicas estratégias disponíveis para interromper a cadeia de transmissão. É importante ressaltar que estudos demonstram que a maioria dos pacientes com LTA foi infectada pela via vertical, por meio da amamentação, e até o momento não há cura para esta doença de alta letalidade, sendo a única forma de romper esta via de transmissão, a abstenção da amamentação.

A CONITEC (Comissão Nacional de Incorporações de Tecnologias), em sua 45ª reunião, no dia 05 de maio de 2016, deliberou por recomendar a inclusão na Tabela do SUS de procedimentos laboratoriais por técnicas de *Western Blot* e PCR em tempo real no diagnóstico de LTA associada ao HTLV-1, por meio do Registro de Deliberação nº 192/2016. Com essa medida, espera-se que haja diagnóstico mais precoce dessa doença, para estabelecer intervenções, mesmo que paliativas, no tratamento dos pacientes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016d).

Nesse trabalho foi possível investigar a prevalência do HTLV1/2 no grupo de gestantes de alto risco, e com os dados obtidos realizou-se o aconselhamento adequado quanto à abstenção da amamentação nas pacientes HTLV positivas, visto que, de acordo com a literatura, foi descrito e concluído que quanto maior o tempo de amamentação, maior a carga proviral para o lactente. Elevada carga proviral e títulos de anticorpos maternos têm sido descritos como fatores de risco associados à transmissão vertical do HTLV-1/2 (HISADA et al., 2002). Bloquear a transmissão vertical, com o acesso ao aconselhamento e orientações adequadas é fundamental para interromper a transmissão vertical pela amamentação.

8 CONCLUSÃO

De acordo com os objetivos propostos conclui-se que:

- A necessidade da investigação de anticorpos anti-HTLV em pacientes gestantes, uma vez que foram encontrados resultados reagentes.
- A utilização dos testes moleculares padronizados, para confirmar resultados reagentes, em testes de triagem, possibilitou atender ao algoritmo para o diagnóstico laboratorial do HTLV-1 e 2 preconizado pelo Ministério da Saúde.
- Os dados clínicos e epidemiológicos obtidos das gestantes soropositivas para o HTLV, comparados com o grupo das mulheres soronegativas, não apresentaram diferenças. No entanto, devido a baixa positividade não foi possível estabelecer correlação entre os grupos. Os resultados observados com esse estudo contribuem para justificar a introdução da pesquisa de anticorpos anti-HTLV, em gestantes de alto risco, e reforçam a necessidade de confirmação dos resultados sorológicos, com métodos complementares mais específicos, como *Western Blot* e molecular como PCR.
- O desenvolvimento do projeto propiciou uma interação entre o diagnóstico laboratorial e clínico, permitindo a introdução do algoritmo recomendado pelo Ministério da Saúde, além de estabelecer o manejo e aconselhamento destas pacientes, quanto ao aleitamento.

9 PERSPECTIVAS

- Testar os familiares de mulheres soropositivas e avaliar as possíveis rotas de transmissão.
- Estabelecer um fluxo de acompanhamento longitudinal da progressão da infecção nas pacientes e familiares.

REFERÊNCIAS

- ABRAMS, A.; AKAHATA, Y.; JACOBSON, S. The prevalence and significance of HTLV-I/II seroindeterminate Western blot patterns. **Viruses**, v. 3, n. 8, p. 1320–1331, ago. 2011.
- ADES, A. E.; PARKER, S.; WALKER, J.; EDGINTON, M.; TAYLOR, G.P.; WEBER, J.N. Human T cell leukaemia/lymphoma virus infection in pregnant women in the United Kingdom: population study. **British Medical Journal**, v. 320, n. 7248, p. 1497-1501, jun. 2000.
- ALARCON, J. O.; FRIEDMAN, H. B.; MONTANO, S. M.; ZUNT, J. R.; HOLMES, K. K.; QUINNAN, G. V. High endemicity of human T-cell lymphotropic virus type 1 among pregnant women in Peru. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr.**, v. 42, p. 604–609, 2006.
- ALLAIN J. P.; HODGES, W.; EINSTEIN, M. H.; GEISLER, J.; NEILLY, C.; DELANEY, S. et al. Antibody to HIV-1, HTLV-I, and HCV in three populations of rural Haitians. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr.**, v. 5, p. 1230–1236, 1992.
- ALTAMIRANO, N. A. et al. Quantitation of HTLV-I proviral load by a real-time PCR assay using SYBR Green: comparison of two methods for DNA isolation. **Journal of virological methods**, v. 170, n. 1-2, p. 160–164, dez. 2010.
- ANDERSON, D. W. et al. Serological confirmation of human T-lymphotropic virus type I infection in healthy blood and plasma donors. **Blood**, v. 74, n. 7, p. 2585–2591, 15 nov. 1989.
- ANDERSSON, S.; DIAS, F.; MENDEZ, P.J.; RODRIGUES, A.; BIBERFELD, G. HTLV-I and -II infections in a nationwide survey of pregnant women in Guinea-Bissau, West Africa. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol**, v.15, n.4, p. 320–322, 1997.
- ANDRADA-SERPA, M.J.; TOSWILL, J.; SCHOR, D.; LINHARES, D.; DOBBIN, J.; PEREIRA, M.S. Seroepidemiologic survey for antibodies to human retroviruses in human and nonhuman primates in Brazil. **Int J Cancer**, v. 44, n. 3, p. 389-393, 1989.
- ANDRADE, R. G. et al. Evaluation of the use of real-time PCR for human T cell lymphotropic virus 1 and 2 as a confirmatory test in screening for blood donors. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 2, p. 111-115, 2010.
- ANDRADE-FILHO, A.S.; BRITES, C.; SANTOS, S.R.; HARRINGTON JUNIOR, W.; REINHARDT, I.C.; FREITAS, F.M. Human T-cell leukaemia/lymphoma virus type I and type II as a common etiology of myelopathies in Bahia, Brazil. **Bras J Med Biol Res**, v. 29, p. 757-761, 1996.

ANDRADE, C.A.; SOARES, E.S.; LIMA-MARTINS, M.V.; ANDRADE, A.M.C.; GONÇALVES, R.C.; CARNEIRO-PROIETTI, A.B.F. et al. Seroprevalence of human immunodeficiency virus type 1 and human T-cell leukaemia/lymphoma virus type I and type II in labour women and their neonates in a government maternity in Belo Horizonte, Brazil. In: **11th International Conference on AIDS**; 1996 July 7-12; Vancouver, Canada.

ANVISA. Resolução RDC nº 153, de 14 de junho de 2004. Determina o Regulamento Técnico para os procedimentos hemoterápicos, incluindo a coleta, o processamento, a testagem, o armazenamento, o transporte, o controle de qualidade e o uso humano de sangue, e seus componentes, obtidos do sangue venoso, do cordão umbilical, da placenta e da medula óssea.

ARAÚJO A.Q.; ALFONSO, C.R.; SCHOR, D.; LEITE, A.C.; ANDRADA-SERPA, M.J. Clinical and demographic features of HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) in Rio de Janeiro, Brazil. **Acta Neurol Scand.**, v. 88, n. 1, p. 59-62, 1993.

ARMAH, H. B.; NARTER-OLAGA, E. G.; ADJEI, A. A.; ASOMANING, K.; GYASI, R. K.; TETTEY, Y. Seroprevalence of human T-cell lymphotropic virus type I among pregnant women in Accra, Ghana. **J. Med. Microbiol.**, v. 55, pt. 6, p. 765–777, 2006.

BALTIMORE, D. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumor viruses. **Nature**, v. 226, n. 5252, p. 1209-1211, 1970.

BARMAK, K.; HARHJ, E.W.; WIGDAHL, B. Mediators of central nervous system damage during the progression of human T-cell leukemia type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **J Neurovirol.**, v. 9, n. 5, p. 522-529, 2003.

BERINI, C. A. et al. Comparison of four commercial screening assays for the diagnosis of human T-cell lymphotropic virus types 1 and 2. **Journal of virological methods**, v. 147, n. 2, p. 322–327, fev. 2008.

BIDDISON, W.E.; KUBOTA, R.; KAWANISHI, T.; TAUB, D.D.; CRUIKSHANK, W.W.; CENTER, D.M. et al. Human T cell leukemia virus type I (HTLV-1)-specific CD8+ CTL clones from patients with HTLV-1-associated neurologic disease secrete proinflammatory cytokines, chemokines, and matrix metalloproteinase. **J. Immunol.**, v. 159, n. 4, p. 2018-2025, 1997.

BIGLIONE, M. et al. High prevalence of human T-cell leukaemia/lymphoma virus infection among blood donors in Jujuy, northwest Argentina. In: **8th International Conference on Human Retrovirology: HTLV**; 1997 June 9-13; Rio de Janeiro, Brazil.

BITTENCOURT, A.L. Transmissão vertical do vírus linfotrópico para a célula T humana tipos I e II (HTLVI/II). **J Bras Ginecol.**, v. 108, n. 6, p.187-194, 1998.

BITTENCOURT, A.; DOURADO, I.; FILHO, P. B.; SANTOS, M.; VALADÃO, E.; ALCÂNTARA, L. C. J.; GALVÃO-CASTRO, B. Human T-cell lymphotropic virus type 1 infection among pregnant women in Northeastern Brazil. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome**, v. 26, n. 5, p. 490-494, 2001.

BITTENCOURT, A. L. et al. No evidence of vertical transmission of HTLV-I in bottle-fed children. **Rev Inst Med Trop**, São Paulo, v. 44, n.2, p. 63-65, 2002.

BITTENCOURT, L. H. F. B. et al. Soroepidemiologia da toxoplasmose em gestantes a partir da implantação do Programa de Vigilância da Toxoplasmose Adquirida e Congênita em municípios da região oeste do Paraná. **Rev Bras Ginecol Obstet.**, v. 34, n. 2, p. 63-68, 2012.

BLATTNER, W. A. et al. The human type-C retrovirus, HTLV, in Blacks from the Caribbean region, and relationship to adult T-cell leukemia/lymphoma. **Int J Cancer**, v.30, n. 3, p.257-264, 1982.

BLUMER, S. O. et al. Human T-lymphotropic virus type I/II. Status of enzyme immunoassay and western blot testing in the United States in 1989 and 1990. **Archives of pathology & laboratory medicine**, v. 116, n. 5, p. 471–476, maio 1992.

BORELLI, S. D.; MAZZOLA, J. C.; MATTA, A. C. G.; TAKEMOTO, A. Y.; BÉRTOLI, M. Blood discard rate and the prevalence of infectious and contagious diseases in blood donors from provincial towns of the state of Paraná, Brazil. **Rev Bras Hematol Hemoter.**, v. 35, n. 6, p. 395-399, 2013.

BRAGA, A. A.; LIMA A. L. C.; ARAÚJO, C. C.; MORATO, B. A.; BARBOSA, R. N. F.. Análise da soroprevalência de HTLV I/II em doadores de sangue de PATOS-PB. *Facene/Famene*, v. 10, n. 1, p. 7-10, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento Nacional de Auditoria do SUS. Coordenação de sistemas de informação. Gabinete do Ministro. Portaria nº 1376, de 19 de novembro de 1993. Aprova normas técnicas para coleta, processamento e transfusão de sangue. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2 de dezembro de 1993. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/1376-93.pdf>>. Acesso em: 13 nov. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria PRT/GM/MS nº 2135, de 22 de dezembro de 1994. Aprova alterações na Portaria 1376/1993, a qual aprova normas técnicas para coleta, processamento e transfusão de sangue. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 24 de dezembro de 1994. Disponível em: <http://redsang.ial.sp.gov.br/site/docs_leis/ps/ps27.pdf>. Acesso em: 13 nov. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria da Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. Área Técnica de Saúde da Mulher. **Pré-natal e puerpério: Atenção qualificada e humanizada**. Manual técnico. Caderno 5. Brasília, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de ações programáticas estratégicas. Gestação de Alto Risco: Manual Técnico. 5. ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010. 320 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de Microbiologia Clínica para o controle de infecção relacionada à assistência   saúde. Módulo 9: Infecções virais. Brasília: Anvisa, 2013, 124 p.

BROUTET, N.; SOUSA, A.Q.; BASILIO, F.P.; S  , H.L.; SIMON, F.; DABIS, F. Prevalence of HIV-1, HIV-2 and HTLV antibody in Fortaleza, Ceará, Brazil, 1993-1994. **Int J STD AIDS**, v. 7, n. 5, p. 365-9, 1996.

CALATINNI, S.; CHEVALIER, A.S.; DUPREZ, R. et al. Discovery of a new human T-cell lymphotropic virus (HTLV-3) in Central Africa. **Retrovirology**, v. 2, n. 30, p.1-4, 2005.

CAMPIONI, P.; GOLETTI, S.; NANNI, M.; NAPOLI. M.; PALLADINO, F.; VALENTINI, A.L. iagnostic imaging of neurogenic bladder. **Rays**, v. 27, n. 2, p. 121-125, 2002.

CARNEIRO-PROIETTI, A.B.F.; LIMA-MARTINS, M.V.; PASSOS, V.M.; CARMO, R.A.; PINHEIRO, S.R.; ROCHA, P.R. et al. Presence of human immunodeficiency virus (HIV) and Tlymphotropic virus type I and type II (HTLV I/II) in a haemophiliac population in Belo Horizonte, Brazil, and correlation with additional serological results. *Haemophilia*, v. 4, n. 1, p. 47-50, 1998.

CASTRO, N.; OLIVEIRA, P.; FREITAS, D.; RODRIGUES, W.; MUNIZ, A; CARVALHO, E. Erectile dysfunction and HTLV-I infection :a silente problem. **Int J Import Res.**, v. 17, n. 4, p. 364-369, 2005.

CASTRO-COSTA, C.M.; SALGUEIRO, M.R.; CARTON, H.; VALE, O.C.; ARRUDA, A.M. Tropical spastic paraparesis in northeastern Brazil. **Arq Neuropsiquiatr.**, v. 47, n. 2, p.134-138, 1989.

CATALAN-SOARES, B. C.; PROIETTI, F. A.; CARNEIRO-PROIETTI, A. B. F. Os vírus linfotr picos de células T humanos (HTLV) na última década (1990-2000): aspectos epidemiológicos. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, Uberaba-MG, v.4, n. 2, p.81-95, 2001.

CATALAN-SOARES, B. C.; PROIETTI, F. A. Grupo Interdisciplinar de Pesquisas em HTLV. Vírus-T linfotrópico humano em familiares de candidatos a doação de sangue soropositivos: disseminação silenciosa. **Rev. Panam. Salud Publica**, v.6, n.6, p.387-394, 2004.

CAVALCANTI, M.; FERREIRA-JÚNIOR, O.; PUCCIONI, M.; NOVIS, S.; SCHECHTER, M. HTLV-I-associated neurologic manifestation in four generations of a Brazilian family. **J Acquir Immune Defic Syndr.**, v. 6, n. 2, p. 213-217, 1993.

CAVALCANTI-JR, G.B.; FREIRES, T.C.B.; NETO, M.J.B.; MEDEIROS, A.R. Seroprevalence study of human T-cell leukaemia/ lymphoma virus type I and type II and profile of soropositive blood donors in the Centro de Hematologia e Hemoterapia do Rio Grande do Norte. In: **8th International Conference on Human Retrovirology: HTLV**; 1997 June 9-13; Rio de Janeiro, Brazil.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Leads from the MMWR. Licensure of screening tests for antibody to human T-lymphotropic virus type I. **JAMA**, v. 261, n. 4, p. 513, 518–20, 525, 27 jan. 1989.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Recommendations for counseling persons infected with human T-lymphotropic virus, types I and II.** Centers for Disease Control and Prevention and U.S. Public Health Service Working Group. MMWR. Recommendations and reports: Morbidity and mortality weekly report. Recommendations and reports / Centers for Disease Control, v. 42, n. RR-9, p. 1–13, 25 jun. 1993.

CHEN L.; LIU, D.; ZHANG, Y.; CHENG, H. Foxp3-dependent transformation of human primary CD4+ T lymphocytes by the retroviral protein tax. **Biochem Biophys Res. Commun.**, v. 23, n. 466, issue 3, p. 523-529, 2015.

CIMINALE, V. et al. Complex splicing in the human T-cell leukemia virus (HTLV) family of retroviruses: novel mRNAs and proteins produced by HTLV type I. **Journal of Virology**, v. 66, n. 3, p.1737-1745, 1992.

COLIN, D. D. et al. Prevalência da infecção pelo vírus linfotrópico humano de células T e fatores de risco associados à soropositividade em doadores de sangue da cidade de Rio Branco, AC, Brasil (1998-2001). **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** São Paulo, v. 36, n.6, p. 677-683, 2003.

CONSTANTINE, N. T.; CALLAHAN, J. D.; WATTS, D. M.; CONSTANTINE, N. T. Retroviral testing: Essentials for quality control and laboratory diagnosis. Boca Raton, FL: CRC Press. 1992.

COOPER, S.A.; van der LOEFF, M.S.; TAYLOR, G.P. The neurology of HTLV-1 infection. **Pract Neurol.**, v. 9, n. 1, p. 16-26, 2009.

CORTES, E.; DETELS, R.; ABOULAFIA, D.; LI, X.L.; MOUDGIL, T.; ALAM, M.; HO, D.D. et al. Human immunodeficiency virus type 1 and type 2 and human T-cell leukaemia/lymphoma virus type I infection in high risk groups in Brazil. **N Engl J Med.**, v. 320, p. 953-958, 1989.

COSTA, E. A. S. et al. Falha na implantação de um novo algoritmo de testes laboratoriais para o diagnóstico de infecção por HTLV-1 e HTLV-2 em população de risco. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 68, n. 2, p.314-317, 2009.

COSTA, E. A. S.; MAGRI, M.C.; CATERINO-DE-ARAÚJO, A. The best algorithm to confirm the diagnosis of HTLV-1 and HTLV-2 in at-risk individuals from São Paulo, Brazil. **Journal of Virological Methods**, v. 173, n. 2, p. 280-286, 2011.

COURTOIS, F.; BARIN, F.; LARSEN, M.; BROSSARD, Y.; MASSELIN, A.; ENGELMAN, P. HTLV-I/II infection in pregnant women in Paris. **Lancet**, v. 335, n. 8697, p. 1103, 1990.

DAL FABBRO, M.M.; CUNHA, R.V.; BÓIA, M.N.; PORTELA, P.; BOTELHO, C.A.; FREITAS, G.M. et al. Infecção pelo HTLV 1/2: atuação no pré-natal como estratégia de controle da doença no Estado de Mato Grosso do Sul. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 41, n. 2, p. 148-151, 2008.

DE ALMEIDA, S.M.; NOGUEIRA, M.B.; MIRAVALLHES, R.; MESTRE, T.; BARBOSA, F.J. et al. Impact of Human T-Lymphotropic Virus (HTLV I/II) Diagnosis on the Frequency of Mood Disorders in a Non-Endemic Area. **Int J Virol AIDS**, v. 2, n. 1, p. 1-3, 2015.

DA COSTA, C. A. et al. Familial transmission of human T-cell lymphotropic virus: silent dissemination of an emerging but neglected infection. **PloS Negl Trop Dis**, v.7, n.6, e.2272, 2013.

DE LIMA, W. M. G.; ESTEVES, F. A. M.; TORRES, M. M. R.; PIRES, E. S. F.. Prevalence of human T- cell lymphotropic vírus types 1 and 2 in blood donos of the Caruaru Blood Center (Hemope). **Rev Bras Hematol Hemoter**., v. 35, n. 4, p. 268-271, 2013.

DENIS, F.; VERDIER, M.; CHOUT, R.; RAMIANDRISOA, H.; SANGARE, A.; PRINCE-DAVID, M. et al. Prevalence of HTLV-1 virus in pregnant women in Black Africa, Martinique, and foreigners living in France. **Bull. Acad. Natl. Med.**, v. 172, n. 5, p. 717–722, 1988.

DETANICO, L.; BASSO, R.M.C. Toxoplasmose: perfil sorológico de mulheres em idade fértil e gestantes. **Rev Bras Anal Clin.**, v. 38, n. 1, p. 15-18, 2006.

DOURADO, I.; ANDRADE, T.; MONTES, J.C.; AZEVEDO, C.; GALLO, D.; GALVÃO-CASTRO, B. Human retrovirus in a Brazilian city with a population predominantly of African origin: evidences for high prevalence of human T-cell leukaemia/lymphoma virus type I and human immunodeficiency virus type I among infection drug users (IDU). Salvador; 1997 [Estudo Multicêntrico – Projeto Brasil].

ESTES, M. C.; SEVALL, J. S. Multiplex PCR using real time DNA amplification for the rapid detection and quantitation of HTLV I or II. **Molecular and cellular probes**, v. 17, n. 2-3, p. 59– 68, 2003.

FARIAS-DE-CARVALHO, S.M.; POMBO-DE-OLIVEIRA, M.S.; THULER, L.C.; RIOS, M.; COELHO, E.M.; CATOVSKY, D et al. HTLV-I and HTLV-II infections in hematologic disorder patients, cancer patients, and healthy individuals from Rio de Janeiro, Brazil. **J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.**, v. 15, n. 3, p. 238-242, 1997.

FERREIRA JÚNIOR, O.C.; VAZ, R.S.; CARVALHO, M.B.; GUERRA, C.; FABRON, A.L.; ROSEMBLIT, J.; HAMERSCHLAK, N. Human T-lymphotropic virus type I and type II infections and correlation with risk factors in blood donors from São Paulo, Brazil. *Transfusion*, v. 35, n. 3, p. 258-263, 1995.

FERREIRA, O. C.; PLANELLES, V.; ROSENBLATT, J. D. Human T-cell leukemia viruses: epidemiology, biology, and pathogenesis. **Blood Ver.**, v.11, n. 2, p.91-104, 1997.

FIGUEIRÓ-FILHO, E. A. et al. Human T-cell leukemia virus infection in pregnant women in a Central-Western state of Brazil. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 12, p.719-725, 2005.

FIGUEIRÓ-FILHO, E.A. et al. Frequência das infecções pelo HIV-1, rubéola, sífilis, toxoplasmose, citomegalovírus, herpes simples, hepatite B, hepatite C, doença de chagas e HTLV I/II em gestantes, do Estado de Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 2, p.181-187, 2007.

FRANCHINI, G. ; STREICHER, H. et al. Human T-cell leukaemia virus. **Baillieres Clin Haematol**, v. 8, n. 1, p. 131-148, 1995.

FURUTA, R. A. et al. Reevaluation of confirmatory tests for human T-cell leukemia virus Type 1 using a luciferase immunoprecipitation system in blood donors. **Transfusion**, v. 55, n. 4, p. 880–889, abr. 2015.

FUKUMOTO, R.; ANDRESEN, V.; BIALUK, T. et al. In vivo genetic mutations define predominant functions of the human T-cell leukemia/lymphoma virus p12I protein. **Blood**, v. 113, n. 16, p.3726-3734, 2009.

GALLO, R. C. et al. Origin of human T-cell leukemia-lymphoma Virus. **Lancet**, v.2, N. 8356, p. 962-963, 1983.

GALLO, D. et al. Sensitivities of radioimmunoprecipitation assay and PCR for detection of human T-lymphotropic type II infection. **Journal of clinical microbiology**, v. 32, n. 10, p. 2464– 2467, out. 1994.

GALVÃO-CASTRO, B. et al. Distribution of humanT-lymphotropic virus type I among blood donors: a nationwide Brazilian study. **Transfusion**, v. 37, n. 2, p. 242-243, 1997.

GARCIA, C.; FARINON, J.; SALAPATA, S.; ONSTEN, T.; SCROFERNEKER, M.L. Estudo do perfil sociodemográfico de doadores de sangue soropositivos para HTLV-1 e 2 em Porto Alegre, Brasil. **Rev Ciênc Méd Pernambuco**, v. 7, n. 2, p. 37, 2011.

GESSAIN, A. et al. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. **Lancet**, v. 2, n. 8452, p. 407-410, 1985.

GESSAIN, A.; de Thé, G. What is the situation of human T cell lymphotropic virus type II (HTLV-II) in Africa ? Origin and dissemination of genomic subtypes. **J. Acq. Immun. Def. Synd. Hum. Retrovirol**, v. 13, suppl 1: S228–S235, 1996.

GESSAIN, A. Retrovirus humains HTLV-1 et HTLV-2. **EMC-Maladies Infectieuses**, v.1, n.3, p.203-220, 2004.

GESSAIN, A.; CASSAR, O. Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. 388, p. 1-23, 2012.

GHEZELDASHT, S.A.; SHIRDEL, A. et al. Human T Lymphotropic Virus Type I (HTLV-I) Oncogenesis: Molecular Aspects of Virus and Host Interactions in Pathogenesis of Adult T cell Leukemia/Lymphoma (ATL). **Iran J Basic Med Sci.**, v. 16, n. 3, p. 179-95, 2013.

GIBELLINI, D. et al. A rapid hemi-nested PCR for HTLV-I detection. **Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology**, v. 28, n. 3, p. 341–343, dez. 2003.

GOMES, F. V.; JUNIOR, J. E. HTLV II em doadores de sangue na Hemorrede do Ceará. **Rev Assoc Med Bras.**, v. 57, n. 3, p. 315-318, 2011.

GONÇALVES, D. U. et al. HTLV-I associated infective dermatitis may be an indolent HTLV-I associated lymphoma. **Braz J Infect Dis.**, v. 4, n. 2, p.100-102, 2000.

GONGORA-BIANCHI, R.A.; LAL, R.B.; RUDOLPH, D.L.; CASTRO-SANSORES, C.; GONZALEZ-MARTINEZ, P.; PAVIA-RUZ, N. Low prevalence of HTLV-II in Mayan Indians in the Yucatan Peninsula, Mexico. **Arch Med Res.**, v. 28, n. 4, p. 555-558, 1997.

GOUBAU, P.; DESMYTER, J.; SWANSON, P.; REYNDERS, M.; SHIH, J.; SURMONT, I. et al. Detection of HTLV-I and HTLV-II infection in Africans using type-specific envelope peptides. **J. Med. Virol.**, v. 39, n. 1, p. 28–32, 1993.

GREEN, P. L.; CHEN, I. S. Y. Human T-cell leukemia virus types 1 and 2. **Fields virology**, 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, p. 1941-1969, 2001.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symp. Ser.**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HANCHARD, B.; GIBBS, W.N.; LOFTERS, W.; CAMPBELL, M.; WILLIAMS, E.; WILLIAMS, N.; JAFFE, E.; CRANSTON, B.; PANCHOO SINGH, L.D.; LAGRENADE, L.; WILKS, R.; MURPHY, E.; BLATTNER, W.; MANNS, A. **Human Retrovirology: HTLV**. Blattner WA (ed). Raven Press: New York, p. 173–183, 1990.

HINO, S.; YAMAGUCHI, K.; KATAMINE, S.; SUGIYAMA, H.; AMAGASAKI, T.; KINOSHITA, K. et al. Mother-to-child transmission of human T-cell leukemia virus type-I. **Jpn. J. Cancer Res.** 76, n. 6, 474–480, 1985.

HINUMA, Y. Adult T cell leukemia virus (ATLV): a serological study. **Gan To Kagaku Ryoho**, v.9, n.8, p.1313-1320, 1982.

HISADA, M.; OKAYAMA, A.; SHIOIRI, S.; SPIEGELMAN, D.L.; STUVER, S.O.; MUELLER, N.E. Risk factors for adult T-cell leukemia among carriers of human T-lymphotropic virus type I. **Blood**, v. 92, n. 10, p. 3557-61, 1998a.

HISADA, M.; OKAYAMA, A.; TACHIBANA, N.; STUVER, S.O.; SPIEGELMAN, D.L.; TSUBOUCHI, H. et al. Predictors of level of circulating abnormal lymphocytes among human T-lymphotropic virus type I carriers in Japan. **Int J Cancer**, v. 77, n. 2, p. 188-192, 1998b.

HISADA, M. et al. Virus markers associated with vertical transmission of human T lymphotropic virus type 1 in Jamaica. **Clin Infect Dis**, v. 34, n. 12, p. 1551-1557, 2002.

HJELLE, B. Human T-cell leukemia/lymphoma viruses: life cycle, pathogenicity, epidemiology, and diagnosis. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v.115, n.5, p.440-450, 1991.

HJELLE, B. et al. Chronic neurodegenerative disease associated with HTLV-II infection. **Lancet**, v. 339, n. 8794, p.645-646, 1992.

HOLLSBERG, P. Mechanisms of T-cell activation by human T-cell lymphotropic virus type I. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 63, n. 2, p. 308-33, 1999.

JEFFERY, K.J.; SIDDIQUI, A.A.; BUNCE, M.; LLOYD, A.L.; VINE, A.M.; WITKOVER, A.D. et al. The Influence of HLA class I alleles and heterozygosity on the outcome of human T cell lymphotropic virus type I infection. **J Immunol**, v. 165, n. 12, p. 7278-84, 2000.

JACOBSON, S.; RAINE, C.S.; MINGIOLI, E.S.; McFARLIN, D.E. Isolation of an HTLV-1-like retrovirus from patients with tropical spastic paraparesis. **Nature**, v. 331, n. 6156, p. 540-3, 1988.

KAJIYAMA, W. et al. Intrafamilial transmission of adult T-cell leukemia virus. **J Infect Dis**, v.154, n. 5, p.851-857, 1986a.

KAJIYAMA, W. et al. Seroepidemiologic study of antibody to adult T-cell leukemia virus in Okinawa, Japan. **Am J Epidemiol**, v.123, n.1, p.41-7, 1986b.

KALYANARAMAN, V. S. et al. A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. **Science**, v. 218, n. 4572, p.571-573, 1982.

KAPLAN, J.E.; OSAME, M.; KUBOTA, H. The risk of development of HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis among persons infected with HTLV-I. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 3, n. 11, p.1096-1101, 1990.

KASHIWAGI, K. et al. A diminuição da transmissão de mãe para filho do T vírus linfotrópico humano (HTLV-I), em Okinawa, no Japão. **Am J Trop Med Hyg**, v.70, n.2, p.158-1163, 2004.

KAZANJI, M.; GESSAIN, A. Human T-cell lymphotropic virus types I and II (HTLV-I/II) in French Guiana: clinical and molecular epidemiology. **Cad Saúde Pública**, v.19, n. 5, p.1227-1240, 2003.

KILPP, E.D. **Estudo soroepidemiológico do HTLV-I/II em bancos de sangue na cidade de Curitiba, no período de 1994 a 2015**. Trabalho de Conclusão de Curso (Disciplina TCC II do Curso de Graduação em Biomedicina) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

KITAGAWA, T.; FUJISHITA, M.; TAGUCHI, I.; MIYOSHI, I.; TADOKORO, H. Antibodies to HTLV-I in Japanese immigrants in Brazil. **JAMA**, v. 256, n. 17, p. 2342, 1986.

KONDO, T. et al. Risk of adult T-cell leukaemia/lymphoma in HTLV –I carriers. **Lancet**, v. 2, n. 8551, p. 159, 1987.

KORALNIK, I.J.; LEMP, J.F. Jr, GALLO, R.C.; FRANCHINI, G. In vitro infection of human macrophages by human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I (HTLV-I). **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 8, n. 11, p. 1845-1849, 1992.

KORALNIK, I.J.; FULLEN, J.; FRANCHINI, G. The p12I, p13II, and p30II proteins encoded by human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I open reading frames I and II are localized in three different cellular compartments. **J Virol.**, v. 67, n. 4, p. 2360-2366, 1993.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. Mega7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol.*, v.33, n. 7, p. 1870-1874, 2016.

KURODA, Y; MATSUI, M.; TAKASHIMA, H.; KUROHARA, K. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-1 increase in cerebrospinal fluid, but not in serum, of HTLV-I-associated myelopathy. **J. Neuroimmunol.**, v. 45, n. 1-2, p. 133-6, 1993.

LAGRENADE, L.; SCHWARTZ, R. A.; JANNIGER, C. K. Childhood dermatitis in the tropics: with special emphasis on infective dermatitis, a marker for infection with human T-cell leukemia virus-I. **Cutis**, v. 58, n. 2, p.115-118, 1996.

LAGRENADE, L. et al. Clinical, pathologic, and immunologic features of human T-lymphotropic virus type I-associated infective dermatitis in children. **ArchDermatol**, v. 134, n. 4, p.439-444, 1998.

LAGRENADE, L. et al. Infective dermatitis of Jamaican children: a marker for HTLV-I infection. **Lancet**, v. 336, n. 8727, p. 1345-1347, 1990.

LAL, R.B.; BRODINE, S.; KAZURA, J.; MBIDDE-KATONGA, E.; YANAGIHARA, R.; ROBERTS, C. Sensitivity and specificity of a recombinant transmembrane glycoprotein (rgp21)-spiked western immunoblot for serological confirmation of human T-cell lymphotropic virus type-I and type-II infections. **J Clin Microbiol.**, v. 30, n. 2, p. 296-299, 1992.

LE BLANC, P.; DOKHÉLAR, M. C. HTLV-1 Structural Proteins. **Virus Research**, v.78, n. 1-2, p.5-16, 2001.

LEE, H.; ANDERSON, E.; ALLAIN, J.P.; GONZAGA, A. HTLV-1 infection in Brazil. **Blood**, v. 73, n. 6, p. 1742, 1989.

LEE, T.H. et al. Quantitation of HTLV-I and II proviral load using real-time quantitative PCR with SYBR Green chemistry. **Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology**, v. 31, n. 4, p. 275–82, dez. 2004.

LEE, J. M.; AHN, S. H. Quantification of HBsAg: basic virology for clinical practice. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 17, n. 3, p. 283–9, jan. 2011.

LESSA, I.; MORAES, D.; MOURA, L.; MELO, A. HTLV-I and myelopathy in Salvador (northeastern Brazil); a case control study. **Arq Neuropsiquiatr.**, v. 51, n. 4, p. 447-451, 1993.

LI, M.; GREEN, P. L. Detection and quantitation of HTLV-1 and HTLV-2 mRNA species by realtime RT-PCR. **Journal of virological methods**, v. 142, n. 1-2, p. 159–68, jun. 2007.

LIMA, L.H.; VIANA, M.C. Prevalence and risk factors for HIV, syphilis, hepatitis B, hepatitis C, and HTLV-1/2 infection in low-income postpartum and pregnant women in Greater Metropolitan Vitória, Espírito Santo State, Brazil. **Cad Saúde Pública**, v. 25, n. 3, p. 668-76, 2009.

LOPES, B. P. T. **Avaliação dos fatores de risco associados à transmissão do HTLV-1 e do HTLV- 2, em doadores de sangue, na cidade de Belém do Pará.** Dissertação de Mestrado em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários. Universidade Federal do Pará, Belém, 2006.

LOPES, M. S. S. N.; PROIETTI, A. B. F. C. HTLV-1/2 transfusional e hemovigilância: a contribuição dos estudos de look-back. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 30, n. 3, p. 229-240, 2008.

LORENZETTI, L.S.; MENNA-BARRETO, M.; SCHOELERM, C.; ANTONIANI, E.; STAUB, H. High prevalence of human Tcell leukaemia/lymphoma virus type I infection among patients with rheumatoid arthritis living in Porto Alegre, Brazil. **J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol**, 20: P097, 1999.

MAEHAMA, T. Human T cell leukemia virus-1 in pregnancy. **Int. J. Gynaecol. Obstet.**, v. 87, n. 3, p.247–248, 2004.

MAGALHÃES, T.; MOTA-MIRANDA, A.C.; ALCANTARA, L.C.; OLAVARRIA, V.; GALVÃO-CASTRO, B.; RIOS-GRASSI, M.F. Phylogenetic and molecular analysis of HTLV-1 isolates from a medium sized town in northern of Brazil: tracing a common origin of the virus from the most endemic city in the country. **J Med Virol.**, v. 80, n. 11, p. 2040-2045, 2008.

MALONEY, E.M.; BIGGAR, R.J.; NEEL, J.V.; TAYLOR, M.E.; HAHN, B.H.; SHAW, G.M.; BLATTNER, W.A. Endemic human T-cell lymphotropic virus type II infection among isolated Brazilian Amerindians. **J Infect Dis.**, v. 166, n. 1, p.100-107, 1992.

MALONEY, E. M.; YAMANO, Y.; VANVELDHUISEN, P. C.; SAWADA, T.; KIM, N.; CRANSTON, B. et al. Natural history of viral markers in children infected with human T lymphotropic virus type I in Jamaica. **J. Infect. Dis.**, v. 194, n. 5, p. 552-560, 2006.

MANOS, M.M.; TING, Y.; WRIGHT, D.K.; LEWIS, J.; BROKER, T.R.; WOLINSKY, S.M. The use of polimerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. **Cancer Cells**, v. 7, p. 209-214, 1989.

MARTINS-CASTRO, L.H.; CHAVES, C.J.; CALLEGARO, D.; NÓBREGA, J.P.S.; SCAFF, M. HTLV-I associated myelopathy in Brazil; a preliminary report. **Arq Neuropsiquiatr.**, 47, n. 4, p. 501-502, 1989.

MATSUOKA, M.; JEANG, K.T. Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 4, p. 270-280, 2007.

MAUCLÈRE, P.; LE HESRAN, J.Y.; MAHIEUX, R.; SALLA, R.; MFOUPOUENDOUN, J.; ABADA, E.T. et al. Demographic, ethnic, and geographic differences between HTLV-I-seropositive carriers and persons with HTLV-I Gag-indeterminate Western blots in Central Africa. **J Infect Dis.**, v. 176, n. 2, p. 505-509, 1997.

MEIRELES, A.; MOREIRA, E.D. JR; MORENO-CARVALHO, O.A.; BADARÓ, R.; MELO, A. Human T-cell Leukaemia/lymphoma Virus type I associated myelopathy in Salvador (northeastern Brazil). **Arq Neuro-Psiquiatr.**, v. 50, n. 2, p.189-190, 1992.

MELLO et al. HTLV-1 in pregnant women from the Southern Bahia, Brazil: a neglected condition despite the high prevalence. **Virology Journal**, v. 11, n. 28, p.11-28, 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **HTLV-III - Triagem e diagnóstico sorológico em unidades hemoterápicas e laboratórios de saúde pública**. Brasília: Ministério da Saúde, Coordenação Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS. Coordenação de Sangue e Hemoderivados. Série TELELAB; 1998. 54p.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e AIDS. **Guia de Manejo Clínico do paciente com HTLV**. Série Manuais, n. 58. Brasília - Distrito Federal, 2004. 52 p.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais. **Guia de Manejo Clínico da Infecção pelo HTLV**. Brasília, 2013; 80 p.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das DST, Aids e Hepatites Virais (DDAHV). **Boletim Epidemiológico HIV-AIDS**; ano V, n. 01. Brasília, 2016a.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das DST, Aids e Hepatites Virais (DDAHV). **Boletim Epidemiológico Sífilis**; v. 47, n. 35. Brasília, 2016b.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das DST, Aids e Hepatites Virais (DDAHV). **Boletim Epidemiológico Hepatites Virais**; ano V, n. 01. Brasília, 2016c.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias – CONITEC. Relatório de Recomendações. **Western Blot e PCR em tempo real em pacientes com leucemia/linfoma de células T do adulto associado ao HTLV-1**. nº 220, p.6-8, 2016d.

MOCHIZUKI, M.; WATANABE, T.; YAMAGUCHI, K. et al. Uveitis associated with human T-cell lymphotropic virus type I. **American Journal of Ophthalmology**, v. 114, n. 2, p. 123-129, 1992.

MOCHIZUKI, M. et al. HTLV-I uveitis. **J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol**, v. 13, n. 1, p. S50-6, 1996.

MONTEIRO, D.L.M. et al. Prevalence of HTLV-1/2 in pregnant women living in the metropolitan area of Rio de Janeiro. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 9, p. e3146, 2014.

MOREIRA, E.D.; RIBEIRO, T.P.; SWANSON, P.; SAMPAIO, C.; MEIO, A.; BRITES, C.; BADARO, R.; TOEDTER, G.; LEC, H.; HARRINGTON, W. Seroepidemiology of human T-cell lymphotropic virus type I/II in Northeastern Brazil. **J Acq Immune Defic Syndr.**, v. 6, n. 8, p. 959-963, 1993.

MOTA, A.; NUNES, C.; MELO, A.; ROMEO, M.; BOASORTE, N. A Case-Control Study of HTLV-Infection among Blood Donors in Salvador, Bahia, Brazil - Associated Risk Factors and Trend towards Declining Prevalence. **Rev. bras. hematol. hemoter.**, v. 28, n. 2, p. 120-126, 2006.

MOXOTO, I. et al. Perfil sociodemográfico, epidemiológico e comportamental de mulheres infectadas pelo HTLV-1 em Salvador-Bahia, uma área endêmica para o HTLV. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** [online], v. 40, n.1, p.37-41, 2007.

MUELLER, N.; OKAYAMA, A.; STUVER, S.; TACHIBANA, N. Findings from the Miyazaki cohort study. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.**, v. 13, supl 1: S2–S7, 1996.

NAKAUCHI, C.M.; LINHARES, A.C.; MARUYAMA, K.; KANZAKI, L.I.; MACEDO, J.E.; AZEVEDO, V.N.; CASSEB, J.S. Prevalence of human T-cell leukemia virus - I (HTLV) antibody among populations living in the Amazon region of Brazil (preliminary report). **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 85, n. 1, p. 29-33, 1990.

NAMEN-LOPES, M.S.; MARTINS, M.L.; DRUMMOND P.C.; LOBATO R.R.; INTERDISCIPLINARY HTLV RESEARCH GROUP (GIPH), CARNEIRO-PROIETTI, A.B. Lookback study of HTLV-1 and 2 seropositive donors and their recipients in Belo Horizonte, Brazil. **Transfusion Med.**, v.19, n. 4, p. 180-188, 2009.

NASCIMENTO, O.J.M.; ARAÚJO, A.Q.C.; FREITAS, M.R.G.; ESCADA, T.M.; ANDRADA-SERPA, M.J. Peripheral nerve involvement in HTLV-I-associated myelopathy (abstract 67). **J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.**, v. 10, p. 230, 1995.

NISOLE, S.; SAIB, A. Early steps of retrovirus replicative cycle. **Retrovirology**, v. 1, n. 9, p. 1-20, 2004.

NOVOA, P.; GRANATO, G. F. H.; BARUZZI, R. G.; HALL, W. W. Evidence for and the rate of mother-to-child transmission of human T-cell leukaemia/lymphoma virus type II among Kaiafo Indians, Brazil. In: **8th International Conference on Human Retrovirology: HTLV**; 1997 June 9-13; Rio de Janeiro, Brazil.

OHBO, K.; SUGAMURA, K.; SEKIZAWA, T.; KOGURE, K. Interleukin-6 in cerebrospinal fluid of HTLV-I-associated myelopathy. **Neurology**, v. 41, n. 4, p. 594-5, 1991.

OKOCHI, K.; SATO, H.; HINUMA, Y. A retrospective study on transmission of adult T cell leukemia virus by blood transfusion: seroconversion in recipients. **Vox Sang**, v. 46, n. 5, p. 245- 253, 1984.

OLALEYE, D. O.; EKWEOZOR, C. C.; SHENG Z.; RASHEED, S. Evidence of serological cross-reactivities with human immunodeficiency virus types 1 and 2 and human T-lymphotropic virus types I and II in sera of pregnant women in Ibadan, Nigeria. **Int. J. Epidemiol.**, v. 24, n. 1, p. 198–203, 1995.

OLBRICH NETO, J.; MEIRA, D.A. Soroprevalence of HTLV- 1/2, HIV, siphylis and toxoplasmosis among pregnant women seen at Botucatu - São Paulo - Brazil: risk factors for HTLV-1/2 infection. **Rev Soc Bras Med Trop.**, v. 37, n. 1, p. 28-32, 2004.

OLIVEIRA, J.T.; CARNEIRO-PROIETTI, A.B.F.; LIMA-MARTINS, M.V.C.; MARTINS, M.L.; PROIETTI, F.A. Erectile insufficiency as first symptom of HTLV I/II associated myelopathy. **Arq Neuropsiquiatr.**, v. 56, n. 1, p. 123-5, 1998.

OLIVEIRA, M. de F. et al. Infective dermatitis associated with the human T-cell lymphotropic virus type I in Salvador, Bahia, Brazil. **Clin Infect Dis.**, v. 40, n. 11: e90-96, 2005.

OLIVEIRA, S.R.; AVELINO, M.M. Human T-cell lymphotropic virus type I seroprevalence among pregnant women in Goiânia, GO, Brazil. **Rev Bras Ginecol Obstet.**, v. 28, n. 8, p. 467-72, 2006.

OLIVEIRA, P.; CASTRO, N.M.; CARVALHO, E.M. Urinary and sexual manifestations of patients infected by HTLV-I. **Clinics.**, v. 62, n. 2, p. 191-196, 2007.

OLIVEIRA, E. H.; SILVA, F. L.; SILVA, M. L. Perfil epidemiológico dos doadores de sangue infectados pelo vírus HTLV I/II no estado do Piauí. *Revista Interdisciplinar*, v. 8, n. 1, p. 149-156, 2015.

OSAME, M. et al. Human T-cell Leukaemia/lymphoma Virus type I associated myelopathy, a new clinical entity [letter]. **Lancet**, v. 1; p. 1031-1032, 1986.

OSAME M.; JANSSEN, R.; KUBOTA, H. Nationwide survey of HTLV-I-associated myelopathy in Japan: association with blood transfusion. **Ann Neurol.**, v. 28, n. 1, p.50-56, 1990.

OSAME, M. Review of WHO Kagoshima meeting and diagnostic guidelines for HAM/TPS. In.: Blattner WA (ed). **Human retrovirology: HTLV**. New York: Raven Press, p. 191-197, 1990.

PAIVA, A.; CASSEB, J. Origin and prevalence of human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and type 2 (HTLV-2) among indigenous populations in the Americas. **Rev. Inst. Med. Trop.**, Sao Paulo, v. 57, n.1, p.1-13, 2015.

PANCAKE, B. A. et al. Determination of the true prevalence of infection with the human T-cell lymphotropic viruses (HTLV-I/II) may require a combination of biomolecular and serological analyses. **Proc Assoc Am Physicians**, v. 108, n. 6, p. 444-448, 1996.

PEREIRA, G. C.; BONAFÉ, S. M. Soroprevalência para doenças infecto-contagiosas em doadores de sangue da cidade de Maringá, Paraná. **Revista UNINGÁ**, v. 43, p.16-24, 2015.

PINHEIRO, S.R.; CARNEIRO-PROIETTI, A.B.F.; LIMA-MARTINS, M.V.; PROETTI, F.A.; ORÉFICE, F. Human T-cell leukaemia/lymphoma virus type I and type II seroprevalence in 55 Brazilian patients with idiopathic uveitis. **Rev Soc Bras Med Trop.**, v. 29, n. 4, p. 383-384, 1996.

POIESZ, B. J. et al. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 77, n. 12, p. 7415-7419, 1980.

POIESZ, B. J. et al. Comparative performances of an HTLV-I/II EIA and other serologic and PCR assays on samples from persons at risk for HTLV-II infection. **Transfusion**, v. 40, n. 8, p. 924–930, ago. 2000.

POMBO DE OLIVEIRA, M.S.; MATUTES, E.; FAMADAS, L.C.; SCHULTZ, T.F.; CALABRO, M.L.; NUCCI, M. et al. Adult T-cell leukaemia/lymphoma in Brazil and its relation to HTLV-I. **Lancet**, v. 336, n. 8721, p. 987-990, 1990.

POMBO DE OLIVEIRA, M.S. An update of human T-cell leukaemia/lymphoma virus type I and type II infections studies in Brazil. In: **8th International Conference on Human Retrovirology: HTLV**; 1997 June 9-13; Rio de Janeiro, Brazil.

PORTELA, P.C. Prevalência e diagnóstico laboratorial da infecção pelo vírus HTLV em gestantes de Mato Grosso do Sul, no período de 2002 a 2006. 2008. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde), Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

PROIETTI, F. A. et al. Epidemiologia da infecção pelo HTLV-I e doenças associadas. **Oncogene**. 2005.

PROIETTI, A. B. F. C. **Cadernos hemominas HTLV**. 6.ed. atualizada e aumentada. Belo Horizonte: Fundação Hemominas, 2015. 651 p.

RAFATPANAH, H. et al. No Evidence of HTLV-II Infection Among Immunoblot Indeterminate Samples Using Nested PCR in Mashhad, Northeast of Iran. **Iranian journal of basic medical sciences**, v. 16, n. 3, p. 229–34, mar. 2013.

RAMOS V. F.; FERRAZ F. N. Perfil epidemiológico dos doadores de sangue do Hemonúcleo de Campo Mourão-PR no ano de 2008. **Rev. Saúde e Biol.**, v.5, n.2, p.14-21, jul./dez 2010.

REICHE, E.M.V.; MORIMOTO, H.K.; FARIAS, G.N.; HISATSUGU, K.R.; GELLER, L.; GOMES, A.C.L.F.; INOUE, H.Y.; RODRIGUES, G.; MATSUO, T. Prevalência de tripanossomíase americana, sífilis, toxoplasmose, rubéola, hepatite B, hepatite C e da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana, avaliada por intermédio de testes sorológicos, em gestantes atendidas no período de 1996 a 1998 no hospital Universitário Regional Norte do Paraná (Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 6, p. 519-527, 2000.

RIBAS, J.; MELO, G. Human T-cell lymphotropic virus type 1(HTLV-1)-associated myelopathy. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 35, n. 4, p. 377-384, 2002.

RIBEIRO, M.; PROIETTI, F.; MARTINS, M.; JANUÁRIO, J.; PUGLIA LADEIRA, R.; OLIVEIRA, M. et al. Geographic distribution of human T-lymphotropic virus types 1 and 2 among mothers of newborns tested during neonatal screening, Minas Gerais, Brazil. **Rev Panam Salud Publica**, v. 27, n. 5, p. 330-337, 2010.

ROMANOS, M. et al. Inhibitory effect of extracts of Brazilian marine algae on human T-Cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) - induced syncytium formation in vitro. **Cancer Investigation**, v. 20, n. 1, p. 46-54, 2002.

ROSADAS, C. et al. Validation of a quantitative real-time PCR assay for HTLV-1 proviral load in peripheral blood mononuclear cells. **Journal of virological methods**, v. 193, n. 2, p. 536–41, nov. 2013.

ROUCOUX, D.F.; MURPHY, E.L. The epidemiology and disease outcomes of human T- lymphotropic virus type II. **AIDS Rev.**, v, 6, n. 3, p. 144-154, 2004.

SABINO, C.E.; DE CARVALHO, S.M.F. **Cadernos Hemominas**; v. 16, cap. 3, p. 73-83. 6ªed. Belo Horizonte: FUNDAÇÃO HEMOMINAS, 2015.

SANCHEZ G.; VÁZQUEZ, P. Seroprevalencia de HTLV-I en donantes de sangre. **Rev Med Chile**, v. 119, p. 600, 1991.

SANTOS, F. L. N.; LIMA, F. W. M. Epidemiologia, fisiopatogenia e diagnóstico laboratorial da infecção pelo HTLV-I. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 41, n. 2, p. 105-16, 2005.

SATO, S. F. Prevalência e características demográficas de doadores de sangue reagentes para o vírus da imunodeficiência humana, Hepatite B, Hepatite C e HTLV. Dissertação (Especialização em Microbiologia Aplicada) – Setor de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

SEQUEIRA, C.G.; TAMEGÃO-LOPES, B.P.; SANTOS, E.J.M.; VENTURA, A.M.R.; MORAES-PINTO, M.I.; SUCCI, R.C.M. Descriptive study of HTLV infection in a population of pregnant women from the state of Pará, Northern Brazil / Estudo descritivo da infecção pelo HTLV em uma população de gestantes do Estado do Pará, norte do Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop.**, v. 45, n. 4, p. 453-456, 2012.

SHIMOTOHNO, K. et al. Complete nucleotide sequence of an infectious clone of human T-cell leukemia virus type II: an open reading frame for the protease gene. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, v. 82, n. 10, p. 3101-3105, 1985.

SHIMOYAMA, M. Diagnostic criteria and classification of clinical sub-types of adult T-cell leukemia lymphoma. A report from the Lymphoma Study Group (1984-78). **British Journal of Haematology**, v.79, n. 3, p. 428-437, 1991.

SODROSKI, J.G. et al. Trans-acting transcriptional activation of the long terminal repeat of human T lymphotropic viruses in infected cells. **Science**, v. 225, n. 4660, p.381-385,1984.

SOUZA et al. Caracterização molecular do HTLV-1 em pacientes com paraparesia espástica tropical: mielopatia associada ao HTLV-1 em Belém, Pará. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 39, n. 5, p. 504-506, 2006.

SOUZA, V.G.; MARTINS, M.L.; CARNEIRO-PROIETTI, A.B.; JANUÁRIO, J.N.; LADEIRA, R.V.; SILVA, C.M. et al. High prevalence of HTLV-1 and 2 viruses in pregnant women in São Luis, state of Maranhão, Brazil. **Rev. Soc Bras Med Trop.** , v. 45, n. 2, p. 159-162, 2012.

SPINA-FRANÇA , A.; LIVRAMENTO, J.A.; MACHADO, L.R.; GOMES, H.R. Human T-cell leukemia/lymphoma virus type I antibodies in serum and cerebrospinal fluid in tropical spastic paraparesis in Brazil. **Arq Neuro-Psiquiatr.**, v. 48, N. 4, p. 441-447, 1990.

SWEET, R. D. A pattern of eczema in Jamaica. **Br J Dermatol**, v. 78, n. 2, p. 93-100,1966.

TAMURA, K.; STECHER, G. D.; PETERSON, F. A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis versão 6.0. **Biology Molecular and Evolution**, v. 30, p. 2725-2729, 2013.

TAKENOUCHI, N.; YAMANO, Y.; USUKU, K.; OSAME, M.; IZUMO, S. Usefulness of proviral load measurement for monitoring of disease activity in individual patients with human T-lymphotropic virus type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **J. Neurovirol.**, v. 9, n. 1, p. 29-35, 2003.

TANGY, F. Molecular Biology of HTLV-I. In: **HTLV, truths and questions**. Zaninovic V. (editors). Colombia, Cali, Feriva Editores, 1996. P. 1-13.

TAYLOR, G. P.; BODÉUS, M.; COURTOIS, F.; PAULI, G.; DEL MISTRO, A.; MACHUCA, A. et al. The seroepidemiology of human T-lymphotropic viruses: types I and II in Europe: a prospective study of pregnant women. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr.**, v. 38, n. 1, p. 104-109, 2005.

TEMIN, H. M.; MIZUTANI, S. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous carcinoma virus. **Nature**, v. 226, n. 5252, p.1211-1213, 1970.

TOMAZINI, M. E.; RODRIGUES, S.; MALTA, M. T.; AZEVEDO, R.; TAKAYANAGUI, O. M.; VALENTE, V. B.; UBIALI, E. M. A.; COVAS, D. T.; KASHIMA, S. HTLV-1/2 seroprevalence and coinfection rate in brazilian first-time blood donors: an 11-year follow-up. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 54, n. 3, p. 123-129, 2012.

TORTEVOYE, P.; TUPPIN, P.; CARLES, G.; PENEAU, C.; GESSAIN, A. Comparative trends of seroprevalence and seroincidence rates of human T cell lymphotropic virus type I and human immunodeficiency virus 1 in pregnant women of various ethnic groups sharing the same environment in French Guiana. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 73, n. 3, p. 560–565, 2005.

THORSTENSSON, R.; ALBERT, J.; ANDERSSON, S. Strategies for diagnosis of HTLV-I and -II. **Transfusion**, v. 42, n. 6, p. 780–91, jun. 2002.

TRENCHI, A.; GASTALDELLO, R.; BALANGERO, M.; IRIZAR, M.; CUDOLA, A.; GALLEGRO, S. Retrospective study of the prevalence of human T-cell lymphotropic virus-type 1/2, HIV, and HBV in pregnant women in Argentina. **J. Med. Virol.**, v. 79, n. 12, p. 1974–1978, 2007.

TSUJI Y, D. H.; YAMABE, T. T.; ISHIMARU, M. T.; HINO, S. Prevenção da transmissão de mãe para filho do vírus linfotrópico de células T humana tipo-I. **Pediatria**, v. 86, n.1, p.11-17, 1990.

UCHIYAMA, T. et al. Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases. **Blood**, v. 50, n. 3, p. 481-492, 1977.

VANDAMME, A. M. et al. Evolutionary strategies of human T-cell lymphotropic virus type II. **Gene**, v. 261, n. 1, p. 171-180, 2000.

VARMA, M. et al. Enhanced specificity of truncated transmembrane protein for serologic confirmation of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2 infections by western blot (immunoblot) assay containing recombinant envelope glycoproteins. **Journal of clinical microbiology**, v. 33, n. 12, p. 3239–44, dez. 1995.

VERNAN, J.C.; BUISSON, G.; MAGDELEINE, J. et al. T lymphocyte alveolitis, tropical spastic paresis and Sjögren's syndrome (letter) **Lancet**, v.1, n. 8578, p.177, 1988.

VIANA, G. M. C.; NASCIMENTO, M. D. S. B.R.; OLIVEIRA, A. S.; SANTOS, A. C. D.; GALVÃO, C. S.; SILVA, M. A. C. N. Seroprevalence of HTLV-1/2 among blood donors in the state of Maranhão, Brazil. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 36, n. 1, p. 50-53, 2014.

VISONÁ, K.; YAMAGUCHI, K.; BONILLA, J. Human T-cell eukaemia/lymphoma virus type I and type II infections in Costa Rica. In: **8th International Conference on Human Retrovirology: HTLV**; 1997 June 9-13; Rio de Janeiro, Brazil.

VRIELINK, H.; REESINK, H.W. HTLV-I/II prevalence in different geographic locations. **Transfus Med Rev.**, v.18, n. 1, p. 46-57, 2004.

WHITE, D. O.; FENNER, F.J. **Medical virology**. 4. ed. San Diego: California. Academic Press, 1994.

WHYTE, G. S. Is screening of Australian blood donors for human T-cell leukaemia/lymphoma virus type I and type II necessary? **Med J Aust**, v. 166, n. 9, p. 478-481, 1997.

WIKTOR, S. Z. et al. Mother-to-child transmission of human T-cell lymphotropic virus type I associated with prolonged breast-feeding. **J Hum Virol**, v. 1, n. 1, p. 37-44, 1997.

WOLFE, N.D.; HENEINE, W.; CARR, J.K. et al. Emergence of unique private T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters. **Proc. Natl. Acad. Sci USA**, v. 102, n. 22, p. 7994-9, 2005.

YDY, R.R.; FERREIRA, D.; SOUTO, F.J.; FONTES, C.J. Prevalence of human T-cell lymphotropic virus (HTLV-1/2) infection among puerperae in Cuiabá, Mato Grosso, 2006. **Rev Soc Bras Med Trop.**, v. 42, n. 1, p. 28-32, 2009.

YAMADA, T. et al. Prevalence of human T-lymphotropic virus type 1 carriers among pregnant women in Hokkaido, Japan. **Microbiol Immunol.**, v. 58, n. 8, p. 427-431, 2014.

YAMAGUCHI K. Human T-lymphotropic virus type I in Japan. **Lancet**, v. 343, n. 8891, p.213–216, 1994.

YASUNAGA, J.; MATSUOKA, M. Human T-cell leukemia virus type I induces adult T-cell leukemia: from clinical aspects to molecular mechanisms. **Cancer Control.**, v.14, n. 2, p. 133-140, 2007.

YOSHIDA, M.; MIYOSHI, I.; HINUMA, Y. Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 79, n. 6, p. 2031-5, 1982.

YOSHIDA, M. Multiple viral strategies of HTLV-1 for dysregulation of cell growth control. **Annu Rev Immunol.**, v.19, p.475-96, 2001.

ZAGO, M.A.; FALCÃO, R.P.; PASQUINI, F. Retrovírus. In: COVAS, D.T. **Hematologia Fundamentos e Prática**. 2º edição. São Paulo: Atheneu, cap.60. p. 691- 704, 2005.

ANEXO 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPANTES GRÁVIDAS

Nós, Luíne Rosele Renaud Vidal, Sérgio Monteiro de Almeida, Meri Bordinon Nogueira e Sonia Mara Raboni, pesquisadores da Universidade Federal do Paraná, estamos convidando _____, RG: _____, Endereço: _____, Telefone: () _____, a participar de um estudo intitulado "Padronização e validação de Métodos Moleculares para o Diagnóstico do HTLV 1 e 2". Embora o Ministério da Saúde indique a utilização dos testes confirmatórios para o diagnóstico das infecções por HTLV, não há até o momento kits comerciais disponíveis no Brasil, portanto este exame não é realizado. O objetivo desta pesquisa é padronizar e validar um teste diagnóstico acurado e preciso para nortear o clínico e os serviços de saúde na adoção de medidas de aconselhamento, prevenção e qualidade de vida aos portadores ou pacientes que já desenvolveram doenças devido ao HTLV.

Caso você participe da pesquisa, será necessário:

- Coletar sangue total com EDTA (aproximadamente 20 mL) por punção venosa.
- Responder a um questionário contendo dados epidemiológicos e sobre a doença.
- Se o resultado do seu exame for positivo, você receberá orientações médicas sobre o parto, sugerimos a coleta de sangue do seu filho logo após o nascimento para a pesquisa do vírus HTLV.

Os benefícios esperados com essa pesquisa são:

1. Fornecer um diagnóstico acurado e preciso para nortear o clínico e os serviços de saúde
2. Adotar medidas de aconselhamento, prevenção e qualidade de vida aos portadores ou pacientes que já desenvolveram doenças devido ao HTLV.
3. Estabelecer estudos colaborativos com outros estados ou países definindo as correlações e perfis de imunidade viral desde que o HTLV-1 é um excelente modelo a ser estudado com relação à dinâmica entre o hospedeiro-patógeno e controle imune.

No entanto, nem sempre você será diretamente beneficiado com o resultado da pesquisa, mas poderá contribuir para o avanço científico.

Os pesquisadores Luíne Rosele Renaud Vidal, Meri Bordinon Nogueira, Farmacêuticas Bioquímicas e Sérgio Monteiro de Almeida, médico neurologista e Sonia Mara Raboni, médica Infectologista, coordenadores do Projeto, responsáveis por este estudo poderão ser contatados no telefone: (41) 3360-7974 das 08:00-18:00 horas ou pelo celular (41) 9678-2425; e-mail: virologia@hc.ufpr.br; ou no laboratório de Virologia - Rua Padre Camargo, 280, poderão fornecer-lhe as informações que queira, antes, durante ou depois de encerrado o estudo.

Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como um paciente de pesquisa, poderá contatar o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos - CEP. O CEP trata-se de um grupo de indivíduos com conhecimento científicos e não científicos que realizam a revisão ética inicial e continuada do estudo de pesquisa para mantê-lo seguro e proteger seus direitos. O tratamento orientado pelo seu médico não será alterado. A sua participação neste estudo é voluntária e se você não quiser mais fazer parte da pesquisa poderá desistir a qualquer momento e solicitar que lhe devolvam o termo de consentimento livre e esclarecido assinado. A sua recusa não implicará na interrupção de seu atendimento e/ou tratamento, que está assegurado. A sua identidade será preservada e será mantida a confidencialidade. Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.

Para participação da pesquisa você não terá despesas e você não receberá nenhum auxílio financeiro.

Eu, _____, li esse termo de consentimento e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual concordei em participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento sem justificar minha decisão. Eu entendi e fui informado que serei atendido sem custos para mim. Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

(Assinatura do participante da pesquisa ou responsável legal)

Curitiba, ____/____/____

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste participante ou representante legal para a participação neste estudo.

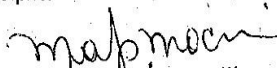
Assinatura do Pesquisador ou quem aplicou o TCLE

Curitiba, ____/____/____

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Rua Gal. Carneiro 181 - Curitiba - Paraná - CEP: 80060-900

Telefone: 3360-1041 E-mail: cep@hc.ufpr.br


MARIA JOSÉ MOCELIN
 Membro do Comitê de Ética em Pesquisa
 em Seres Humanos do HC/UFPR
 Matrícula 7462

Rubricas:
 Sujeito da Pesquisa e /ou responsável
 legal _____

Pesquisador Responsável ou quem
 aplicou o TCLE _____

APÊNDICE 2 - QUESTIONÁRIO APLICADO NA PESQUISA



QUESTIONÁRIO PROJETO HTLV

I - IDENTIFICAÇÃO:

Nome: _____ Data: _____

Data de nascimento: | | -| | -| | | | Cidade: _____ Estado _____

Registro HC: _____

Nome da Mãe: _____

Cidade: _____ Estado: _____

Endereço: _____

Fone-1: () _____ Fone- 2: () _____ Fone- 3: () _____

Morou _____ em _____ outro _____ Estado? _____

_____ Raça: () Branca () Parda () Negra (

) Amarela () Indígena () Sem informação

Escolaridade:

() Nenhuma () Sem informação () Outro: _____

Ensino Fundamental () Incompleto () Completo

Ensino Médio () Incompleto () Completo

Ensino Superior () Incompleto () Completo

II - TIPO DE EXPOSIÇÃO HTLV:

Uso de Droga: () Não () Sim, Qual:

() Endovenosa () Inalação () Tempo de uso

() Sem informação () Outra

Usou ou usa Piercing : () Não () Sim

Possui Tatuagem: () Não () Sim

Atividade Sexual: Início da Atividade Sexual _____

Número total de parceiros desde o início da atividade sexual:

Número de parceiros no último ano: () 1 a 2 () 2 a 5 () > 5/ano () Sem informação

Transfusão Sanguínea: () Não () Sim Quando: | | -| | -_ | | |

Qual o motivo? _____ () Sem informação

Nascimento do entrevistado: Parto Normal () Cesárea () Não sabe informar ()

Amamentação do entrevistado: () Não () Sim, por quanto tempo _____ () Não sabe informar

Histórico Obstétrico:

N.º de gestações: _____ Parto normal: _____ Cesárea: _____ Aborto: _____

Idade Gestacional atual: _____

Uso de Contracepção:

Hormonal: () DIU () Uso de preservativo () nunca () sempre () as vezes
 () Outra: _____

Fumante

Anterior à gestação: () Não () Sim tempo: _____

Número de cigarros por dia: () Até 5 () 5-20 () mais que 20

Durante à gestação: () Não () Sim tempo: _____

Número de cigarros por dia: () Até 5 () 5-20 () mais que 20

Consumo de bebida alcoólica:

Durante à gestação:

() Não () Sim quantidade/x semana: _____

Anterior à gestação:

() Não () Sim quantidade/x semana: _____

Que vacinas foram realizadas (conferir a carteirinha de vacinação):

Rubéola (data): _____

Tétano (data): _____

DTPa - difteria, tétano e coqueluche (data): _____

Hepatite B (data): _____

Hepatite A (data): _____

Influenza (data): _____

_____ Outros (data): _____

III - DADOS DO HTLV

Data do diagnóstico: | | -| | -| | | |

Manifestação Clínica:

Problemas visuais: () sim, quando | | -| | -| | | | () não

Alteração motora:

Fraqueza crônica e progressiva em membros inferiores:

() Sim | | -| | -| | | | Não ()

Alteração Neurológica: _____ sim () Data : | | -| | -| | | | () não

Tremores () sim, quando | | -| | -| | | | () não

Distúrbios de memória () sim, quando: | | -| | -| | | | () não

Hipotenção () sim | | -| | -| | | | () não

Distúrbio Visuomotor () sim | | -| | -| | | | () não

Distúrbios de sensibilidade (áreas adormecidas e sensação de formigamento)

() sim | | -| | -| | | | () não

Perturbação Urinária: () sim | | -| | -| | | | () não

Problemas de Pele: () sim | | -| | -| | | | () não

Diagnóstico atual: _____

IV - INVESTIGAÇÃO DE HTLV-1/II

(SIH207) HTLV - Método de Quimioluminescência (CMIA): () Positivo () Negativo

Data: | | -| | -| | | | () Sem informação () Não realizado

Método de Westen Blot para HTLV:() Positivo () Negativo Data: | | -| | -| | | | |

() Sem informação () Não realizado

PCR qualitativo HTLV: () Positivo () Negativo Data: | | -| | -| | | | |

() Sem informação () Não realizado

PCR em Tempo Real HTLV: () Positivo () Negativo Data: | | -| | -| | | | |

() Sem informação () Não realizado

Outros exames de interesse:

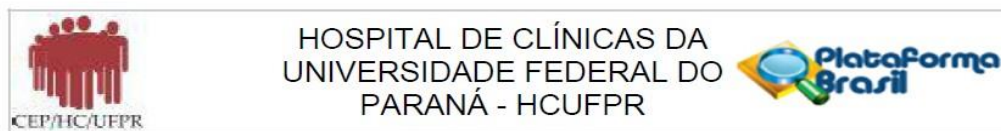
HIV () Triagem () Confirmatório; Outro ____

HCV () Triagem () Confirmatório; Outro ____

Sífilis () Triagem () Confirmatório

Outras infecções associadas: _____

ANEXO 1 - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO CHC-UFPR



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Padronização e validação de métodos moleculares para o diagnóstico do HTLV I e II.

Pesquisador: Luine Rosele Renaud Vidal

Área Temática:

Versão: 7

CAAE: 14058113.0.0000.0096

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná

Patrocinador Principal: Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.141.118

Data da Relatoria: 15/06/2015

Apresentação do Projeto:

A pesquisadora principal apresenta uma emenda ao trabalho, basicamente estendendo os participantes de pesquisa para as gestantes do Hospital Victor do Amaral. Com isto, foram alterados, nas informações do projetos os seguintes itens: Resumo (incluindo o Serviço de Tocoginecologia HC-UFPR e Maternidade Victor Ferreira do Amaral), Introdução (dados sobre a transmissão vertical), Objetivo secundário, Metodologia proposta, Critérios de inclusão e exclusão, Detalhamento, Tamanho da amostra e Grupos dos participantes da pesquisa.

Objetivo da Pesquisa:

1- Fornecer um diagnóstico acurado e preciso para nortear o clínico e os serviços de saúde 2- Adotar medidas de aconselhamento, prevenção e qualidade de vida aos portadores ou pacientes que já desenvolveram doenças devido ao HTLV. 3- Estabelecer estudos colaborativos com outros estados ou países definindo as correlações e perfis de imunidade viral desde que o HTLV-1 é um modelo a ser estudado com relação à dinâmica entre o hospedeiro-patógeno e controle imune.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O risco associado está na punção venosa das participantes de pesquisa, uma vez que serão colhidos cerca de 20 ml de sangue. Os benefícios, além do avanço científico, se apresentam mesmo para as participantes na forma de diagnóstico de eventual transmissão vertical e

Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181

Bairro: Alto da Glória

CEP: 80.060-900

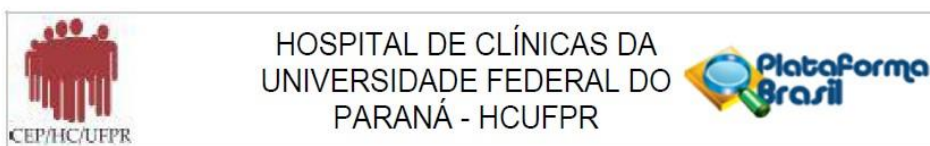
UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-1041

Fax: (41)3360-1041

E-mail: cep@hc.ufpr.br



Continuação do Parecer: 1.141.118

aconselhamento.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Idem aos pareceres anteriores.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O TCLE para as gestantes está redigido de forma clara e completa.

Recomendações:

É obrigatório trazer ao CEP/HC uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido que foi aprovado, para assinatura e rubrica. Após, xerocar este TCLE em duas vias, uma ficará com o pesquisador e uma para o participante da pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Emenda analisada e aprovada.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HC-UFPR, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/2012 e na Norma Operacional Nº 001/2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação da Emenda. Devendo o pesquisador aguardar o parecer final da CONEP sobre o referido documento.

Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios semestrais sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos. Manter os documentos da pesquisa arquivado.

É dever do CEP acompanhar o desenvolvimento dos projetos, por meio de relatórios semestrais dos pesquisadores e de outras estratégias de monitoramento, de acordo com o risco inerente à pesquisa.

Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181
Bairro: Alto da Glória **CEP:** 80.060-900
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3360-1041 **Fax:** (41)3360-1041 **E-mail:** cep@hc.ufpr.br